



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**«ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΓΚ»**  
**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**  
**ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΑ Β. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**«ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΓΚ»**  
**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**  
**ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΑ Β. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010**

*«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»*

**Ημερομηνία αίτησης της κ. Οικονόμου Γεωργίας: 21-12-2005**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 573<sup>α</sup>/7-2-2006**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Παναγιώτου Γεώργιος, Ερευνητής Β' Ινστιτούτου «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-3-2006**

«Πρωτεομική ανάλυση σε κυτταρικά συστήματα καρκίνου του παχέος εντέρου»

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 668<sup>α</sup>/13-10-2009**

1. Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Λέκκα Μαρία - Ελένη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Παπαμαρκάκη Θωμαΐς Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Κωλέττας Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Παναγιώτου Γεώργιος, Ερευνητής Β' Ινστιτούτου «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»
6. Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-10-2010

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Γουδέβενος Ιωάννης**

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

**Η Γραμματέας της Σχολής**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ**



Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» υπό την επίβλεψη του Διευθυντή του Ινστιτούτου Δρ. Γ. Παναγιώτου, τον οποίο ευχαριστώ για την τόσο ενδιαφέρουσα περιήγηση στο μαγευτικό κόσμο της έρευνας. Εμπιστεύτηκα τις δυνατότητές μου και με υπομονή, επιμονή και κατανόηση καθοδήγησε το ταξίδι των ερευνητικών εμπειριών μου. Μου έδωσε τη δυνατότητα να διευρύνω τους ερευνητικούς μου ορίζοντες συμμετέχοντας σε συνέδρια και εκπαιδευτικά σεμινάρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Φώτση Θεόδωρο και Επίκουρο Καθηγήτρια Πολίτου Αναστασία, για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τις Αναπληρώτριες Καθηγήτριες Θωμαή Παπαμαρκάκη και Μαρία-Ελένη Λέκκα και τους Επίκουρους Καθηγητές Σάββα Χριστοφορίδη και Ευάγγελο Κωλέττα, στην κρίση των οποίων υποβάλλεται αυτή η διατριβή ευχαριστώ θερμά για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Αξιοσημείωτες, στο σημείο αυτό, είναι οι ετήσιες συναντήσεις με τα υπόλοιπα μέλη του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 #562, Δρ. Α. Πίντζα, Δρ. Κ. Γιαννουκάκο και Δρ. Ρ. Σανδαλτζόπουλο και τους υποψήφιους διδάκτορες Γ. Σφλώμο, Ε. Μακροδούλη, Φ. Φωστήρα και Γ. Θώδη, τους οποίους και ευχαριστώ για τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη, Επιστημονικό και Λειτουργικό Προσωπικό του εργαστηρίου Πρωτεϊνικής Χημείας, υπεύθυνη για τον φασματογράφο μάζας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων πρωτεομικής ανάλυσης. Στάθηκε δίπλα μου άγρυπνος φρουρός της γνώσης και με αστείρευτη υπομονή και αγάπη διευκόλυνε την καθημερινότητά μου.

Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου – υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδακτορικούς ερευνητές – για τη συνεργασία τους καθώς και τους ερευνητές του Κέντρου για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους. Τα τελευταία δύο χρόνια ιδιαίτερη ήταν η συμβολή της Δρ. Βασιλικής Κωστούρου στην πειραματική ολοκλήρωση της διατριβής μου και την ευχαριστώ θερμά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, θέλω να εκφράσω, και για ανθρώπους που βρίσκονται πολλά χρόνια στη ζωή μου και δείχνουν κατανόηση και αποδοχή σε κάθε μου απόφαση. Είναι οι φίλοι και κουμπάροι μου, Γλύκα και Χάρης, και η μικρούλα Άννα που τον τελευταίο χρόνο μου πρόσφεραν μια ζεστή αγκαλιά και ένα δροσερό σπίτι, όπου γράφτηκε μέρος της διατριβής αυτής το καλοκαίρι του 2010 στη Λάρισα. Είναι η Γωγώ και ο Αλέξανδρος που στήριξαν ηθικά την προσπάθειά μου, η Γεωργία και η Αλκμήνη που άκουσαν τους προβληματισμούς μου και μου έδωσαν τις κατάλληλες συμβουλές τη στιγμή που χρειάστηκε. Είναι και οι αδερφές μου, Βάσω και Ειρήνη, που αναζητούσαν τρόπους να με ξεκουράσουν.

Πάντα, όμως, θα ευγνωμονώ τους γονείς μου, Βασίλη και Μαριάνθη, οι οποίοι στηρίζουν με πολλή αγάπη και πίστη τις αποφάσεις μου, ακόμη και αν έρχονται σε σύγκρουση με τα όνειρά τους για μένα. Βιώνουν μαζί μου τα άγχη και τις αγωνίες μου και παρόλο που πολλές φορές δεν καταλαβαίνουν το γιατί, είναι δίπλα μου με υπομονή και προσπαθούν, αποτελεσματικά τις περισσότερες φορές, να τα ξεπεράσουμε. Η λάμψη στα μάτια τους, τη στιγμή της επιτυχίας, είναι η μεγαλύτερη ανταμοιβή όλων των κόπων.

*Όταν τα «ΘΕΛΩ...» και «ΔΕΝ ΘΕΛΩ...»  
κάνουν τα όνειρα παραπραγματικότητα και  
την πραγματικότητα όνειρο*



ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 ΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ .....	2
1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	4
1.2.1 ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ .....	4
1.2.1.1 Χρωμοσωμική αστάθεια .....	4
1.2.1.2 Ατέλειες στην επιδιόρθωση του DNA .....	6
1.2.1.3 Έκτροπη μεθυλίωση του DNA ( <i>aberrant DNA methylation</i> ) .....	6
1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	7
1.2.2.1 APC .....	7
1.2.2.2 TP53 .....	8
1.2.2.3 Ογκοκατασταλτικό μονοπάτι του TGF-β .....	8
1.2.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	9
1.2.3.1 RAS ΚΑΙ BRAF .....	9
1.2.3.2 PI3K .....	9
1.2.4 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ .....	10
1.2.4.1 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ( <i>epidermal growth factor receptor – EGFR</i> ) .....	10
1.2.4.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας ( <i>vascular endothelial growth factor – VEGF</i> ) .....	10
1.2.4.3 Έκτροπη ρύθμιση του μονοπατιού των προσταγλανδινών .....	11
1.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΩΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΡΟΔΡΟΜΟΙ .....	11
1.4. ΣΥΝΕΧΩΣ ΕΝΕΡΓΕΣ, ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ RAS ΚΑΙ Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗΣ (GTPάσης) .....	14
1.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	17

1.6. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ..	18
1.7. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ .....	21
1.8. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ.....	26
1.8.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ.....	28
1.8.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙ3Κ/ΑΚΤ/mTOR .....	30
1.8.3 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ RAL ΜΙΚΡΩΝ ΓΤΡΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ RALGEFS.....	32
1.8.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RAS ΜΕ ΜΟΡΙΑ-ΤΕΛΕΣΤΕΣ.....	33
1.9. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΟΝΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RAS .....	35
1.9.1 ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ.....	35
1.9.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ.....	36
1.9.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΦΥΣΗ.....	37
1.9.4 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	38
ΣΚΟΠΟΣ .....	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ .....	43
2.2 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ .....	43
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ .....	44
2.3.1 ΙΣΟΗΛΕΚΤΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ – ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ.....	44
2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ – ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ.....	46
2.4 ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ.....	46
2.5 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΠΕΨΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΡΥΨΙΝΗ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	47

---

2.6 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ .....	47
2.7 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ .....	48
2.8 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ .....	51
2.9 ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ (GENE ONTOLOGY ANALYSIS-BIOLOGICAL PROCESS) .....	52
2.10 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	52
2.11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	54
2.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ RAS ΓΤΡΑΣΩΝ.....	54
2.12.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ GST-RBD ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ GST-RBD ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.....	55
2.12.2 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ RAS-GTP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ .....	56
2.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ....	56
2.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CDNA .....	57
2.15 ΗΜΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ.....	57
2.16 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HRAS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNAs) ....	58
2.17 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ (ΑΜΕΣΟΣ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΟΣ).....	59
2.18 ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ .....	60

2.19 IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ (INVASION ASSAY).....	60
<i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> .....	63
3.1 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ Caco2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	64
3.2 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΠΟΙΚΙΛΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ (GO ANALYSIS) .....	78
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΔΕΙΧΝΕΙ ΤΟ ΔΙΑΚΡΙΤΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ KRAS <sup>V12</sup> ΚΑΙ HRAS <sup>V12</sup> ΣΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ Caco2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	81
3.4 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS (KIRSTEN ΚΑΙ HARVEY) ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΟΜΟΙΑ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΙΑΣ ΟΜΑΔΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	83
3.5 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	85
3.6 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ KRAS <sup>V12</sup> ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HRAS .....	87
3.7 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HRAS ΣΤΑ Caco2-KRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΟΡΟΥ ΣΤΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	88
3.8 Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HRAS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA) ΑΝΤΙΣΤΡΕΦΕΙ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΩΝ Caco2-KRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	90
3.9 Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HRAS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΙ ΤΗ ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ Caco2-KRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	92

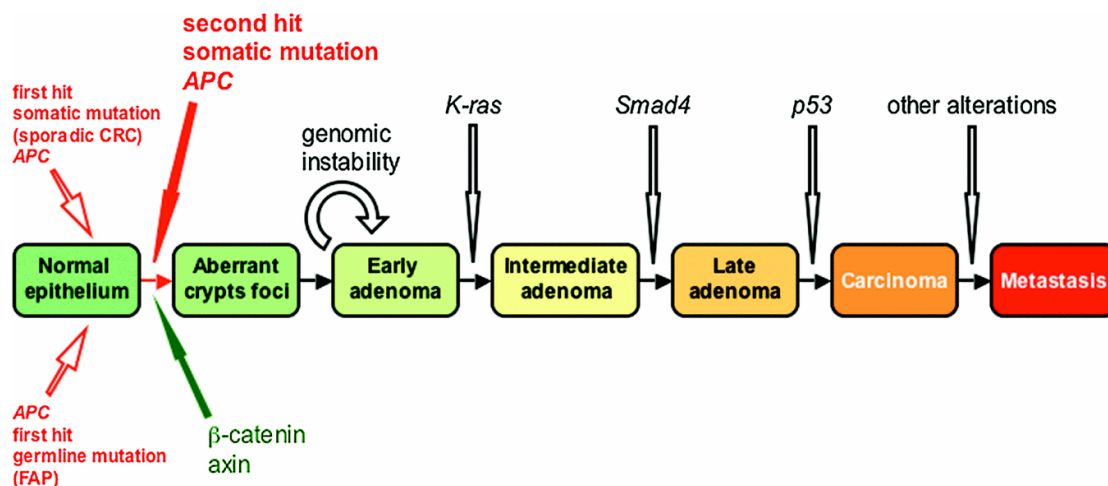
3.10 ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΩΝ ΜΕΣΟΛΑΒΕΙ ΣΤΗ ΘΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS.....	97
<i>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i> .....	99
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i> .....	109
<i>SUMMARY</i> .....	112
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i> .....	114

***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## 1.1 ΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

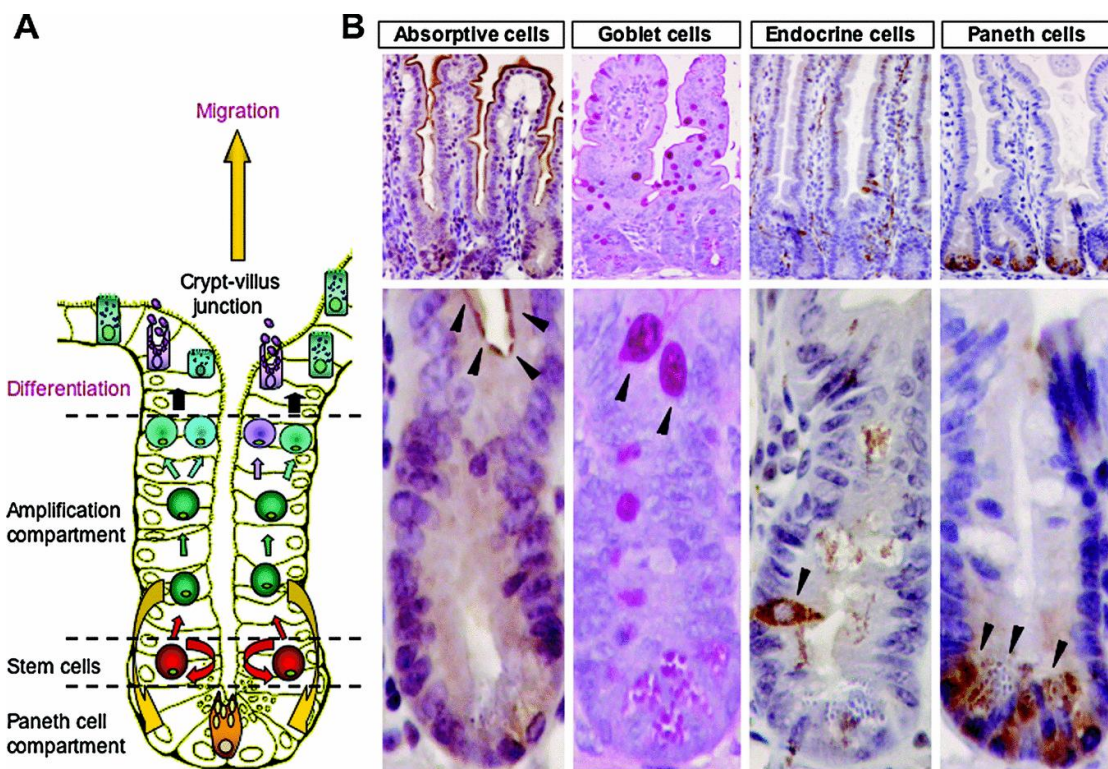
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) είναι η τρίτη αιτία θανάτου σε περιστατικά καρκίνου παγκοσμίως, ακολουθώντας τους φυλο-ειδικούς καρκίνους (προστάτη και μαστού) και τον καρκίνο του πνεύμονα [9]. Εκτός από τη σημασία του για τη δημόσια υγεία, ο ΚΠΕ είναι ένα ελκυστικό μοντέλο για τη μελέτη της μοριακής βάσης του κυτταρικού μετασχηματισμού και της εξέλιξης της ογκογένεσης εξαιτίας (α) των επιθηλιακών καταβολών του, (β) της διαθεσιμότητας δειγμάτων ασθενών από επεμβατικές διαδικασίες, όπως η κολonosκόπηση, τα οποία οδήγησαν στη θεμελίωση και τον εκτενή χαρακτηρισμό κυτταρικών σειρών ΚΠΕ και (γ) της σχετικά σαφούς δομής του ιστού που επιτρέπει την κατανόηση της φυσικής ανάπτυξής του. Για τους λόγους αυτούς, η γενετική βάση της νόσου έχει μελετηθεί και κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό.

Η σχετική ευκολία σε πρόσβαση δειγμάτων ασθενών επέτρεψε στους ερευνητές να σχηματίσουν ένα μοντέλο σταδιακής εξέλιξης από υπερπλαστικό επιθήλιο σε αδένωμα και σε καρκίνωμα και να αξιολογήσουν τις γενετικές αλλαγές στα ενδιάμεσα στάδια. Υπάρχει μια ξεκάθαρη γενετική πρόοδος, η οποία σχετίζεται με την πρόοδο της νόσου [5] (εικόνα Ε1).



**Εικόνα Ε1:** Γενετικό μοντέλο της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου [5]. Μεταλλάξεις στα γονίδια του APC, της β-κατενίνης και της axin είναι απαραίτητα για την έναρξη της καρκινογένεσης. Διαδοχική πρόοδος επέρχεται με γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, Smad4, p53 και άλλα άγνωστα γονίδια.

Το ανθρώπινο έντερο είναι οργανωμένο σε διακριτούς λειτουργικούς επιθηλιακούς αδένες, γνωστούς ως κρύπτες του Lieberkühn. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μια συνεχής επιθηλιακή μονοστιβάδα εγκολπώνεται για να δημιουργήσει τις δομές αυτές. Κάθε κρύπτη προέρχεται από ένα αρχέγονο κύτταρο, το οποίο πιστεύεται ότι βρίσκεται στη βάση της κρύπτης και είναι υπεύθυνο για την αναπλήρωση του επιθηλιακού πληθυσμού που επενδύει τη δομή αυτή [10]. Έχειδειχθεί ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε μια δεδομένη κρύπτη συμβαίνει στα τελευταία 5-10 κύτταρα κατά μήκος του άξονα της κρύπτης. Καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν μέσω αυτής της περιοχής, επιλεκτικά συνιστούν έναν στιγμιαίο πολλαπλασιαστικό πληθυσμό υπεύθυνο για την ανάπτυξη κάθε κρύπτης. Επιπλέον, κατά μήκος του άξονα της κρύπτης, τα κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε τουλάχιστον ένα από τα τρία είδη κυττάρων (βλεννοεκκριτικά κύτταρα, ενδοκρινικά κύτταρα και εντεροκύτταρα) και συνεπώς χάνουν την πολλαπλασιαστική τους δυνατότητα (εικόνα E2).



**Εικόνα E2:** (A) Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των κρυπών Lieberkühn (B) Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση τεσσάρων βασικών κυτταρικών ειδών (με βέλη): απορροφητικά κύτταρα (χρώση με αλκαλική φωσφατάση), βλεννοεκκριτικά κύτταρα (χρώση κατά Schiff), ενδοκρινικά κύτταρα (χρώση με synaptophysin) και κύτταρα Paneth (χρώση με λυσοζύμη) [8].



Το ερώτημα σε ποιο σημείο κατά μήκος του άξονα τα κύτταρα μετασχηματίζονται και ξεκινούν μια νεοπλαστική αλλοίωση είναι το αντικείμενο πολλών ερευνών και μένει ακόμη αναπάντητο. Η χωροχρονική αλληλουχία αυτών των διαδικασιών, η διακριτική ιστολογική εικόνα της κρύπτης, η γρήγορη κινητική αυτού του πληθυσμού και η συχνότητα των νεοπλαστικών γεγονότων συνδυάζονται για να κάνουν το εντερικό επιθήλιο ένα χρήσιμο μοντέλο όπου μπορούν να συσχετισθούν οι μοριακές βιολογικές αλλαγές με αλλαγές στη μορφολογία του ιστού, τον πολλαπλασιασμό, την πιθανή συμβολή του στρώματος, τη διαφοροποίηση και την πρόοδο της νόσου.

## **1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Η κλινική συμπεριφορά του ΚΠΕ, όπως προαναφέρθηκε, προκύπτει από αλληλεπιδράσεις σε πολλά επίπεδα. Στόχος είναι η κατανόηση της μοριακής βάσης της εξατομικευμένης ευπάθειας στον ΚΠΕ και ο καθορισμός των παραγόντων που ξεκινούν την ανάπτυξη του όγκου, καθοδηγούν την εξέλιξή του και επηρεάζουν την απόκρισή του ή την ανθεκτικότητά του σε αντικαρκινικούς παράγοντες. Όσοι από τους παράγοντες αυτούς είναι γνωστοί μέχρι σήμερα παρουσιάζονται συνοπτικά στην **εικόνα Ε3** σε συνδυασμό με την πρόοδο της νόσου και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

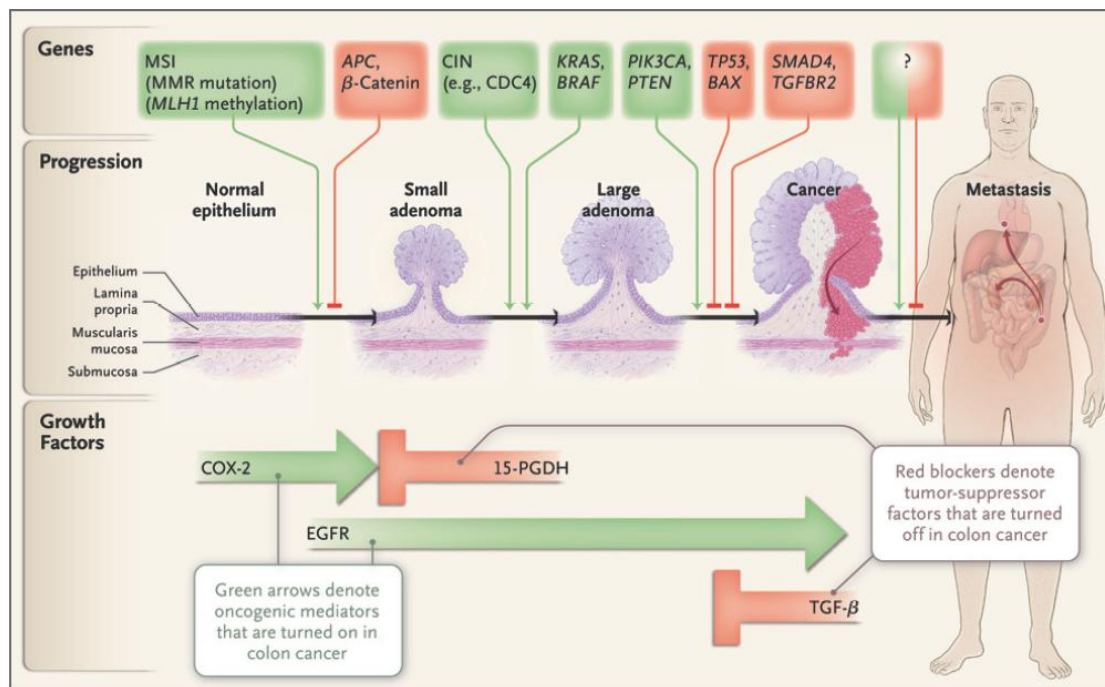
### **1.2.1 ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ**

Η απώλεια της γενομικής σταθερότητας μπορεί να καθοδηγήσει την ανάπτυξη του ΚΠΕ με τη διευκόλυνση της απόκτησης πολλαπλών μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον όγκο.

#### **1.2.1.1 Χρωμοσωμική αστάθεια**

Η πιο κοινή μορφή γενομικής αστάθειας στον ΚΠΕ είναι η χρωμοσωμική αστάθεια, η οποία προκαλεί πολυάριθμες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων των

χρωμοσωμάτων και τη δομή τους [11]. Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για την πρόκληση της απώλειας ενός αγρίου τύπου αντιγράφου ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως είναι το *APC*, το *TP53* και το μέλος 4 της οικογένειας *SMAD* (*SMAD4*), των οποίων η φυσιολογική λειτουργία ανταγωνίζεται τον κακοήγη φαινότυπο. Στον ΚΠΕ, υπάρχουν πολυάριθμες σπάνιες μεταλλάξεις απενεργοποίησης γονιδίων των οποίων ο ρόλος είναι να διατηρούν τη χρωμοσωμική σταθερότητα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και συσσωρευτικά, οι μεταλλάξεις αυτές εξηγούν τη χρωμοσωμική αστάθεια σε τέτοιους όγκους [12]. Σε αντίθεση με κάποιους άλλους καρκίνους, ο ΚΠΕ δεν συμπεριλαμβάνει συνήθως πολλαπλασιασμό των αντιγράφων των γονιδίων [13] ή αναδιάταξη γονιδίων.



**Εικόνα Ε3:** Γονίδια και μονοπάτια που ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και κατευθύνουν την εξέλιξη στον ΚΠΕ [6].

Στην εξέλιξη του ΚΠΕ, οι γενετικές μεταβολές αφορούν γονίδια που φαίνονται στην κορυφή του διαγράμματος. Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας ενεργοποιείται από μία μετάλλαξη σε γονίδιο διόρθωσης της δημιουργίας αντικανονικού ζεύγους βάσεων (*mismatch repair gene*) ή στην έκτροπη μεθυλίωση του *MLH1* και σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *TGFBR1* και *BAX*. Η έκτροπη μεθυλίωση του *MLH1* και οι μεταλλάξεις στο *BRAF* σχετίζονται με το μονοπάτι του αδενώματος. Το ερωτηματικό δηλώνει ότι γενετικές ή επιγενετικές αλλαγές ειδικές για την μεταστατική έκβαση δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Τα κύρια μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων που μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της νεοπλασίας φαίνονται στη βάση του διαγράμματος.

### 1.2.1.2 Ατέλειες στην επιδιόρθωση του DNA

Σε μια υποομάδα ασθενών με ΚΠΕ, υπάρχει απενεργοποίηση γονιδίων που απαιτούνται για την επιδιόρθωση της δημιουργίας αντικανονικών ζευγών βάσεων του DNA (mismatch-repair genes). Η απενεργοποίηση των γονιδίων αυτών μπορεί να είναι κληρονομική, όπως στον κληρονομικό μη πολυποειδή καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC) ή επίκτητη, όπως σε όγκους που παρουσιάζουν αποσιώπηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA, μέσω μεθυλίωσής του. Η απώλεια της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA είναι εύκολα αναγνωρίσιμη από το συσχετιζόμενο επιφανόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας, στην οποία η ανικανότητα επιδιόρθωσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA αλλάζει το μέγεθος των μονο- ή δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (μικροδορυφόροι) που βρίσκονται σε διάφορα σημεία στο γονιδίωμα [14]. Μπορούν ακόμα να απενεργοποιηθούν ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν για τον υποδοχέα τύπου II του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGFBR2) και την BCL2-associated X protein (BAX), τα οποία έχουν λειτουργικές περιοχές που περιέχουν επαναλήψεις μονο- ή δινουκλεοτιδίων.

### 1.2.1.3 Έκτροπη μεθυλίωση του DNA (*aberrant DNA methylation*)

Η επιγενετική αποσιώπηση των γονιδίων, κυρίως μέσω ασυνήθιστης μεθυλίωσης του DNA, είναι ακόμη ένας μηχανισμός απενεργοποίησης των γονιδίων σε ασθενείς με ΚΠΕ [15], [16]. Στο φυσιολογικό γονιδίωμα, η μεθυλίωση της κυτοσίνης συμβαίνει σε περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA έξω από τα εξόνια, με εξαίρεση τις περιοχές των εκκινητών (promoter) που είναι πλούσιες σε CpG (CpG islands) [15]. Σε σύγκριση με το γονιδίωμα του καρκίνου του παχέος εντέρου, υπάρχει μια συνολική μείωση μέτριου βαθμού της μεθυλίωσης της κυτοσίνης αλλά σημαντική απόκτηση έκτροπης μεθυλίωσης μέσα σε συγκεκριμένες περιοχές πλούσιες σε CpG των εκκινητών των γονιδίων. Αυτή η έκτροπη μεθυλίωση των εκκινητών μπορεί να επάγει επιγενετική αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης [15].

## 1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

### 1.2.2.1 APC<sup>1</sup>

Ο ΚΠΕ απαιτεί πολλές γενετικές αλλαγές αλλά συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι καθοριστικά για τον σχηματισμό του όγκου [6]. Μία από αυτές τις αλλαγές, η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού, θεωρείται ως το εναρκτήριο γεγονός στον ΚΠΕ. Η σηματοδότηση μέσω του Wnt μονοπατιού ξεκινά όταν η ογκοπρωτεΐνη β-κατενίνη προσδένει πρωτεΐνες-συνοδούς που βρίσκονται στον πυρήνα, ώστε να σχηματίσουν ένα μεταγραφικό σύμπλοκο που ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική ενεργοποίηση [17]. Το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης ελέγχει τα επίπεδά της μέσω πρωτεόλυσης. Ένα συστατικό του συμπλόκου αυτού, η APC, όχι μόνο αποικοδομεί τη β-κατενίνη αλλά παρεμποδίζει και τον πυρηνικό εντοπισμό της.

Η πιο κοινή μετάλλαξη στον ΚΠΕ απενεργοποιεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη APC. Στην απουσία λειτουργικής APC – του φυσικού αναστολέα της β-κατενίνης, το Wnt μονοπάτι ενεργοποιείται συνεχώς και με λανθασμένο τρόπο. Γαμετικές μεταλλάξεις στην APC προκαλούν οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, ένα κληρονομικό σύνδρομο με προδιάθεση για καρκίνο, όπου πάνω από 100 αδενωματώδεις πολύποδες αναπτύσσονται στους φορείς του μεταλλαγμένου γονιδίου και η πιθανότητα για ΚΠΕ στην ηλικία των 40 ετών είναι σχεδόν 100% [18], [17]. Σωματικές μεταλλάξεις και ελλείψεις (deletions) που απενεργοποιούν και τα δύο αντίγραφα του γονιδίου εμφανίζονται στις περισσότερες περιπτώσεις σποραδικών αδενωμάτων και καρκίνων του παχέος εντέρου [17]. Σε μια μικρή υποομάδα όγκων με αγρίου τύπου APC, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στη β-κατενίνη που εμποδίζουν την αποικοδόμησή της και ενεργοποιούν το Wnt μονοπάτι [19], [20], [17].

---

<sup>1</sup> Ο συμβολισμός των ονομάτων των γονιδίων και των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της HUGO Gene Nomenclature Committee

### 1.2.2.2 TP53

Η απενεργοποίηση του μονοπατιού της p53 μέσω μετάλλαξης στο TP53 είναι το δεύτερο σημαντικό γενετικό γεγονός που συμβαίνει στον ΚΠΕ. Στους περισσότερους όγκους, τα δύο αλληλόμορφα του TP53 είναι απενεργοποιημένα, συνήθως σε συνδυασμό με μία παρανοηματική μετάλλαξη που απενεργοποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα της p53 και μία χρωμοσωμική αποκοπή που περιορίζει το δεύτερο TP53 αλληλόμορφο [21], [22]. Η απενεργοποίηση του TP53 συχνά συμπίπτει με τη μετάβαση από μεγάλα αδενώματα σε διεισδυτικά καρκινώματα [23]. Σε πολλούς ΚΠΕ με αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA, το TP53 παραμένει αγρίου τύπου, παρόλο που σε αυτούς τους καρκίνους, η δραστηριότητα του μονοπατιού της p53 περιορίζεται, πιθανόν από μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη BAX, που επάγει την απόπτωση.

### 1.2.2.3 Ογκοκατασταλτικό μονοπάτι του TGF-β

Η απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β είναι το τρίτο στάδιο στην πρόοδο του ΚΠΕ. Περίπου στο 1/3 των ΚΠΕ, σωματικές μεταλλάξεις απενεργοποιούν τον υποδοχέα τύπου II του TGF-β (TGFBR2) [24], [25], [26], [27]. Σε όγκους με αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA, ο TGFBR2 απενεργοποιείται από μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης [24]. Σε τουλάχιστον τους μισούς όγκους από αυτούς που δεν έχουν πρόβλημα στην επιδιόρθωση του DNA, η σηματοδότηση μέσω TGF-β περιορίζεται με παρανοηματικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δομή της κινάσης του TGFBR2 ή πιο συχνά, με μεταλλάξεις που απενεργοποιούν καθοδικά συστατικά του μονοπατιού, όπως τη SMAD4. Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν το μονοπάτι του TGF-β συμβαίνουν κατά τη μετάβαση από το αδένωμα σε δυσπλασία υψηλού βαθμού ή καρκίνωμα [28].

### 1.2.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ

#### 1.2.3.1 RAS ΚΑΙ BRAF

Πολλά ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή του ΚΠΕ. Ογκογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* και *BRAF*, οι οποίες ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών, συμβαίνουν στο 37% και 13% των ΚΠΕ, αντίστοιχα [29], [30], [31], [32], [33]. Οι μεταλλάξεις στα *RAS*, και κυρίως στο *KRAS*, ενεργοποιούν τη δράση της GTPάσης που ενεργοποιεί κατευθείαν τη RAF. Οι μεταλλάξεις στο *BRAF* ενεργοποιούν τη δράση κινάσης σερίνης-θρεονίνης, η οποία ενεργοποιεί στη συνέχεια, τον «καταρράκτη» των MAPK [32], [33]. Μεταλλάξεις στο *BRAF* έχουν ανιχνευθεί ακόμη και σε μικρούς πολύποδες [29] και, σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο *RAS*, είναι πιο συχνές σε υπερπλαστικούς πολύποδες, «οδοντωτά» αδενώματα και εγγείς ΚΠΕ. Ασθενείς με πολυάριθμες και μεγάλες υπερπλαστικές αλλοιώσεις έχουν αυξημένη πιθανότητα για ΚΠΕ [15], [34], [35], [36], [37].

#### 1.2.3.2 PI3K

Το 1/3 των ΚΠΕ φέρει σωματική μετάλλαξη ενεργοποίησης στο γονίδιο *PI3KCA*, το οποίο κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα της PI3K [38]. Λιγότερο κοινές γενετικές αλλαγές που αντικαθιστούν τις μεταλλάξεις του *PI3KCA* είναι η απώλεια του PTEN, ενός αναστολέα του μονοπατιού της PI3K καθώς και η ενίσχυση του υποστρώματος 2 του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS2), ενός ενεργοποιητή της σηματοδότησης μέσω PI3K [39].

## **1.2.4 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

### *1.2.4.1 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor – EGFR)*

Η ενεργοποίηση των μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων είναι συχνή στον ΚΠΕ. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη που έχει αυξητικά αποτελέσματα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Κλινικές μελέτες προσδίνουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα του EGF (EGFR) σε κάποιες περιπτώσεις ΚΠΕ [40], [41], [42], [43]. Ο EGFR προάγει τη σηματοδότηση μέσω των μονοπατιών των MAP κινασών και της PI3K. Πρόσφατα κλινικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι ο προχωρημένος ΚΠΕ με μεταλλάξεις στα μονοπάτια αυτά, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *KRAS* [44], [45], [46], *BRAF* [47], [48] και της καταλυτικής υπομονάδας p110 της PI3K [49], δεν αποκρίνεται στη θεραπεία που στοχεύει τον EGFR.

### *1.2.4.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor – VEGF)*

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) που παράγεται σε καταστάσεις τραυματισμού ή κατά τη διάρκεια της αύξησης των υγιών ιστών οδηγεί στη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Κλινικές μελέτες προτείνουν ότι τα αγγεογενετικά μονοπάτια παίζουν ρόλο στη δυναμική της αύξησης και της θνησιμότητας του ΚΠΕ. Θεραπεία με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF πρόσθεσε, κατά μέσο όρο, 4.7 μήνες επιβίωσης στο σύνολο των ασθενών με προχωρημένο ΚΠΕ [50].

#### 1.2.4.3 Έκτροπη ρύθμιση του μονοπατιού των προσταγλανδινών

Ένα σημαντικό γεγονός που εμφανίζεται νωρίς στην ανάπτυξη του αδενώματος είναι η ενεργοποίηση της σηματοδότησης των προσταγλανδινών [51], [52]. Αυτή η μη φυσιολογική ενεργοποίηση μπορεί να επάγεται από συνθήκες φλεγμονής ή από την αυξορύθμιση της COX-2, ενός επαγόμενου ενζύμου που μεσολαβεί στη σύνθεση της προσταγλανδίνης E<sub>2</sub>, ενός παράγοντα έντονα συσχετισμένου με τον ΚΠΕ [52]. Η δράση της προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> μπορεί επίσης να αυξηθεί από την απώλεια της αφυδρογονάσης της προσταγλανδίνης (15-PGDH), του ενζύμου που καταλύει την αποικοδόμηση των προσταγλανδινών [53], [54], [55]. Αυξημένα επίπεδα της COX-2 έχουν βρεθεί στα 2/3 περίπου των ΚΠΕ [52], [56] και απώλεια του 15-PGDH στο 80% των ΚΠΕ [53]. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι αναστολή της COX-2 με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αδενωμάτων [57], [58], [59], [60] και μεσολαβεί στην υποχώρηση των ήδη υπάρχοντων [61].

Από τα παραπάνω αναφερόμενα μονοπάτια και γονίδια που διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην εμφάνιση και την ανάπτυξη του ΚΠΕ θα αναλυθεί στη συνέχεια ο ρόλος των γονιδίων *RAS* σε συνδυασμό με την περιγραφή των *RAS* πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών.

### 1.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΩΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΡΟΔΡΟΜΟΙ

Τα κυτταρικά ομόλογα των ικών Harvey- και Kirsten- RAS αλληλουχιών που προκαλούν μετασχηματισμό, ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στο γονιδίωμα του αρουραίου το 1981 [62] και στη συνέχεια στα γονιδιώματα του ποντικού [63] και του ανθρώπου [64]. Αυτές οι ανακαλύψεις, έδειξαν ότι τα ογκογονίδια *RAS* φαίνεται να συμπεριφέρονται σαν το ογκογονίδιο *SRC* του ιού του σαρκώματος Rous, η προέλευση του οποίου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1976 [65]. Συνεπώς, τα πρωτο-ογκογονίδια που βρίσκονται στο γονιδίωμα των φυσιολογικών κυττάρων μπορούν να ενεργοποιηθούν από ρετροϊούς, οι οποίοι ενσωματώνουν και μετατρέπουν τις αλληλουχίες αυτές σε ενεργά ογκογονίδια. Το ογκογονίδιο που



σχετίζεται με τον ιό του σαρκώματος Harvey ονομάζεται *HRAS*, ενώ αυτό που σχετίζεται με τον ιό του σαρκώματος Kirsten ορίζεται ως *KRAS*. Μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αυτών των *RAS* αλληλουχιών ανακαλύφθηκαν σύντομα σε πολλές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, περιλαμβανομένων σειρών ουροδόχου κύστεως, παχέος εντέρου και πνευμόνων [66], [67], [68].

Λεπτομερείς αναλύσεις αλληλούχισης αποκάλυψαν ότι τα ογκογόνα αλληλόμορφα κατά κανόνα διαφέρουν από τα αγρίου τύπου σε σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα πλαίσια ανάγνωσης των διαφόρων *RAS* ογκογονιδίων. Οι απορρέουσες αντικαταστάσεις αμινοξέων συνήθως συμβαίνουν στο κατάλοιπο 12, και λιγότερο συχνά στα κατάλοιπα 13 και 61 [69], [70], [71], [72]. Η συσχέτιση μεταξύ της αντικατάστασης της γλυκίνης σε βαλίνη στο κατάλοιπο 12 της *HRAS* και της υδρόλυσης του GTP έγινε από την ομάδα του Frank McCormick, η οποία παρατήρησε ότι αντισώματα ειδικά για αυτή την περιοχή εμποδίζουν την πρόσδεση του GTP [73]. Οι άλλες ογκογόνες μεταλλάξεις (όπως η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από λευκίνη στο κατάλοιπο 61 της *HRAS*) δείχθηκε επίσης ότι εμποδίζουν την υδρόλυση του GTP [74]. Από το 1983, το τρίτο μέλος της οικογένειας των γονιδίων *RAS*, το *NRAS*, κλωνοποιήθηκε από κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και λευκαϊμίας [75], [76], [77], [78]. Το γονίδιο αυτό βρέθηκε επίσης να φέρει σημειακές μεταλλάξεις ενεργοποίησης σε συγκεκριμένους ανθρώπινους όγκους.

Σύντομα τέθηκε το ερώτημα της αποτελεσματικότητας των μεταλλαγμένων μορφών *RAS* στον μετασχηματισμό πρωτογενών κυττάρων, μιας και ανακαλύφθηκε ότι ένα ογκογονίδιο *RAS* δεν μπορούσε να μετασχηματίσει πρόσφατα απομονωμένα εμβρυικά κύτταρα τρωκτικού. Τρεις αναφορές δημοσιεύθηκαν το 1983 περιγράφοντας την ικανότητα της *HRAS*<sup>V12</sup> να μετασχηματίζει πρωτογενή κύτταρα, τα οποία αρχικά είχαν καταστεί αθάνατα είτε με καρκινογόνα [79] είτε με διαμόλυνση με τα ογκογονίδια *myc*, *SV40 large T antigen* ή *E1A* του αδενοϊού [80], [81]. Αυτά τα αποτελέσματα ενίσχυσαν την άποψη της σταδιακής καρκινογένεσης, προτείνοντας ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *RAS* μπορούν να μετασχηματίσουν κύτταρα, τα οποία ήδη έχουν υποστεί αλλαγές που προδιαθέτουν για μετασχηματισμό. Όπως έχει επιβεβαιωθεί σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους [82], [83], [84], αυτές οι αλλαγές συνήθως αφορούν την απόκτηση από τα κύτταρα της

ικανότητας να πολλαπλασιάζονται ασταμάτητα όταν βρίσκονται σε καλλιέργεια – ο φαινότυπος της αθανатоποίησης των κυττάρων.

Το 1984, μεταλλαγμένα *KRAS* αλληλόμορφα βρέθηκαν σε δείγματα καρκινώματος του πνεύμονα, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι μεταλλάξεις δεν προέκυψαν ως συνέπεια της καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων *in vitro* [85], [86]. Επιπλέον, τα διάφορα *RAS* ογκογονίδια συσχετίστηκαν με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Μεταλλάξεις στο *KRAS* ήταν συχνές σε καρκινώματα του παγκρέατος [87] και του παχέος εντέρου [88], ενώ μεταλλάξεις στο *HRAS* κυρίως βρέθηκαν σε καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως [89] και μεταλλάξεις στο *NRAS* συνδέθηκαν αρχικά με κακοήθειες των λεμφαδένων [90], [91], [92], [93], [94] και μελανώματα [95].

Πειραματικά επαγόμενοι όγκοι βρέθηκαν επίσης να φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS*. Για παράδειγμα, όγκοι στο μαστό και στο δέρμα ποντικών που προήρθαν από την τοπική εφαρμογή καρκινογόνων περιείχαν μεταλλάξεις στο *HRAS* [96], [97], [98], ενώ καρκινώματα στο θύμο αδένα επαγόμενα από καρκινογόνα φέρουν ενεργές μεταλλάξεις στο *NRAS* [99]. Άλλα γνωστά καρκινογόνα, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, βρέθηκαν επίσης να προκαλούν μεταλλάξεις στο *KRAS* σε ποντίκια [100] καθώς και σε κύτταρα σε καλλιέργεια [101]. Παρόλα αυτά, αυτές οι ανακαλύψεις δεν βοήθησαν στην κατανόηση του γιατί οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *RAS* εστιάζονται σε πολύ συγκεκριμένα σημεία του αναγνωστικού πλαισίου αυτών των γονιδίων.

Για λόγους που δεν είναι απόλυτα κατανοητοί, οι ογκογόνες μεταλλάξεις των διαφόρων μελών της οικογένειας *RAS* εμφανίζονται δυσανάλογα σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο *KRAS* εντοπίζονται στο 60% των περιπτώσεων του καρκίνου του παγκρέατος και περίπου στο 20% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα, ενώ μεταλλάξεις στο *HRAS* στο 10% περίπου των περιπτώσεων του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως και μεταλλάξεις στο *NRAS* περίπου στο 20% των περιστατικών μελανώματος και 20% καρκίνου του ήπατος (εικόνα E4).

Cancer type	HRAS	KRAS	NRAS
Biliary tract	0%	33%	1%
Bladder	11%	4%	3%
Breast	0%	4%	0%
Cervix	9%	9%	1%
Colon	0%	32%	3%
Endometrial	1%	15%	0%
Kidney	0%	1%	0%
Liver	0%	8%	10%
Lung	1%	19%	1%
Melanoma	6%	2%	18%
Myeloid leukaemia	0%	5%	14%
Ovarian	0%	17%	4%
Pancreas	0%	60%	2%
Thyroid	5%	4%	7%

*Εικόνα Ε4: Μεταλλάξεις στα HRAS, KRAS και NRAS στον ανθρώπινο καρκίνο [7]*

#### 1.4. ΣΥΝΕΧΩΣ ΕΝΕΡΓΕΣ, ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ RAS ΚΑΙ Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗΣ (GTPάσης)

Οι πρωτεΐνες RAS αρχικά περιγράφηκαν ότι προσδένουν νουκλεοτίδια γουανίνης το 1980 από την ομάδα του Edward Scolnick, η οποία μελετούσε τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της ιικής HRAS πρωτεΐνης [102]. Αυτή η πρόσδεση έδωσε την ιδέα ότι οι RAS μπορεί να λειτουργούν σαν τις ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες, οι οποίες είχαν βρεθεί να έχουν μια εγγενή δράση φωσφατάσης τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTPάσης), η οποία τις εναλλάσσει μεταξύ μιας ενεργής και μιας ανενεργής μορφής. Η επανενεργοποίηση αυτών των G πρωτεϊνών συμβαίνει όταν το προσδεμένο GDP απομακρύνεται κάνοντας χώρο για την πρόσδεση του αφθονότερου κυτταροπλασματικού GTP [103]. Η βιοχημική απόδειξη ότι οι RAS πρωτεΐνες είναι πραγματικά GTPάσες ήρθε μερικά χρόνια αργότερα, το 1984 [104], [105], [106].

Οι πρωτεΐνες RAS ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια μικρών GTPασών, που χαρακτηρίζεται από την κοινή ιδιότητα των μελών της να προσδένουν την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP), και να βρίσκονται, με τον τρόπο αυτό, σε μια ενεργή κατάσταση ενώ υδρολύοντας το GTP σε διφωσφορική γουανοσίνη (GDP)

επιστρέφουν στην ανενεργή κατάσταση [107], [108], [109], [110], [111]. *In vivo*, η διαδικασία αυτή εξαρτάται από ρυθμιστικά μόρια, τα οποία είναι «πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη GTPάση» (GTPase activating proteins - GAPs) και ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον Trahey και συνεργάτες [112] καθώς και «παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανοσίνης» (guanine nucleotide exchange factors - GEFs), οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον Wolfman και συνεργάτες [113]. Οι παράγοντες αυτοί καταλύουν την υδρόλυση του προσδεμένου νουκλεοτιδίου τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) και μεσολαβούν στην απελευθέρωση της διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) που προκύπτει από την υδρόλυση, καθιστώντας ικανή την πρόσδεση ενός νέου μορίου GTP.

Μολονότι η εναλλαγή μεταξύ μιας ενεργούς GTP-προσδεμένης μορφής και μιας ανενεργής GDP-προσδεμένης μορφής που προκύπτει από υδρόλυση είναι μια απλή διαδικασία, η πρόσδεση και η απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων γουανίνης είναι ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο γεγονός μέσα στο κύτταρο. Οι GAPs και οι GEFs υπόκεινται από μόνοι τους σε ξεχωριστή σειρά ρυθμιστικών γεγονότων, τα οποία δεν είναι απόλυτα κατανοητά. Παρά τη σχετική αφθονία του GTP σε σχέση με το GDP στο κυτταρόπλασμα (περίπου 10 φορές παραπάνω), η πλειοψηφία των RAS πρωτεϊνών βρίσκεται στην ανενεργή GDP-μορφή στις περισσότερες κυτταρικές συνθήκες, εξαιτίας της εντυπωσιακά υψηλής υδρολυτικής δραστηριότητας των GAPs. Συγκεκριμένα ερεθίσματα αυξάνουν τον πληθυσμό των RAS μορίων που βρίσκονται στην GTP-μορφή με την ενεργοποίηση GEFs και/ή με την αναστολή των GAPs, υπεύθυνων για τη διευκόλυνση της υδρόλυσης. Διέγερση των T-λεμφοκυττάρων με αντι-CD3 αντισώματα ή με ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C, για παράδειγμα, μπορεί ραγδαία να αυξήσει την αναλογία των RAS μορίων που βρίσκονται στην ενεργή μορφή από 5% σε 80% [114]. Οι πολυάριθμοι παράγοντες που άμεσα ή έμμεσα επηρεάζουν την κατάσταση πρόσδεσης των νουκλεοτιδίων στις πρωτεΐνες RAS προσδίδουν μια μοναδικότητα στη ρύθμισή τους και τους κάνουν απαραίτητους στη μεταγωγή του σήματος.

Οι πρωτεΐνες RAS προσδέουν νουκλεοτίδια γουανίνης με υψηλή συγγένεια σε μια αλληλεπίδραση που εμπλέκει τουλάχιστον 4 μοτίβα: **τα κατάλοιπα 10-18**, που εμπλέκονται στην πρόσδεση των α- και β- φωσφορικών, **τα κατάλοιπα 57-63**, που εμπλέκονται στην πρόσδεση ιόντων  $Mg^{+2}$  και του γ- φωσφορικού του GTP και τις περιοχές που περιλαμβάνουν **τα κατάλοιπα 116-119** και **144-147**, και οι δυο

σημαντικές για την πρόσδεση του δακτυλίου της γουανίνης (**εικόνα E5**). Στην ενεργή τους GTP-μορφή, οι RAS πρωτεΐνες συγκροτούν μια διαμόρφωση διαφορετική από αυτή στην ανενεργή GDP-μορφή τους. Αυτή η αλλαγή στη διαμόρφωση επιτρέπει τις αλληλεπιδράσεις της ενεργής μορφής με μόρια-τελεστές απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του σήματος σε καθοδικούς (downstream) στόχους, οι οποίες διακόπτονται με την υδρόλυση του GTP και την επιστροφή της πρωτεΐνης στην ανενεργή της μορφή [115]. Αυτές οι δομικές αλλαγές ελέγχονται από δύο πολύ κινητικές περιοχές της πρωτεΐνης, που ονομάζονται διακόπτης I (κατάλοιπα 30-40) και διακόπτης II (κατάλοιπα 60-76) [116], [117]. Η περιοχή του διακόπτη I περιλαμβάνει την κύρια δομή αλληλεπίδρασης των μορίων-τελεστών με τις RAS πρωτεΐνες (κατάλοιπα 32-40) και είναι σημαντική για την πρόσδεση και ενεργοποίησή τους καθώς και για την πρόσδεση των GAPs. Οι GEFs, από την άλλη πλευρά, αλληλεπιδρούν με την περιοχή του διακόπτη II. Συνεπώς, το μόριο των RAS πρωτεϊνών εναλλάσσεται μεταξύ της ενεργής GTP-μορφής, στην οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει με μόρια-τελεστές ή με τους GAPs μέσω της περιοχής του διακόπτη I, και της ανενεργής GDP-μορφής, όπου η περιοχή του διακόπτη I είναι μη προσβάσιμη, αλλά μέσω της περιοχής του διακόπτη II μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους GEFs. Και οι δύο περιοχές-διακόπτες είναι κοντά στο  $\gamma$ - φωσφορικό του GTP.

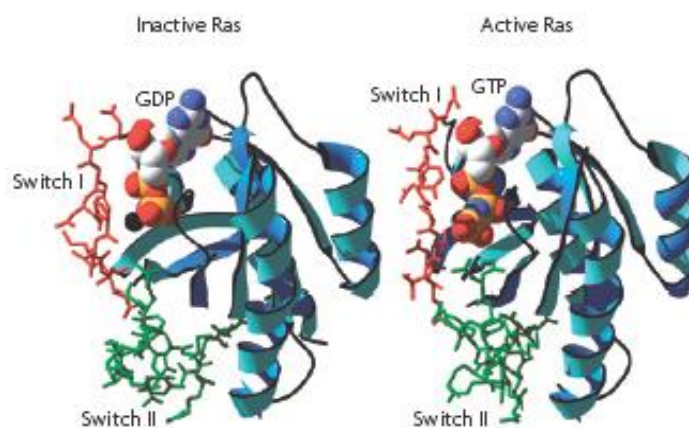
Έτσι, οι αλλαγές στη διαμόρφωση αυτών των περιοχών εμπλέκονται στην πρόσδεση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών και στη μεταγωγή του σήματος σε καθοδικούς στόχους [118], [119].

Όμως, αλληλουχίες εκτός

της περιοχής της **Εικόνα E5: Η δομή των πρωτεϊνών RAS.**

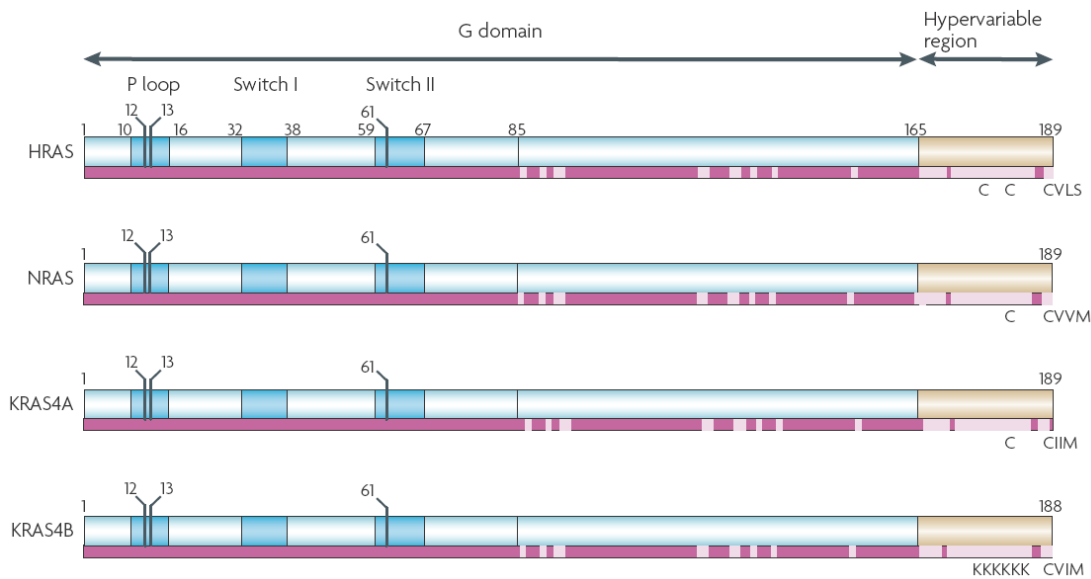
GTPάσης μπορεί να

εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των τελεστών. Όταν η RAS προσδέει το GTP, η κύρια περιοχή πρόσδεσης των τελεστών σχηματίζει μια προσβάσιμη θηλιά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, η οποία παρουσιάζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με πρωτεΐνες-τελεστές [120] (**εικόνα E5**).



## 1.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα τρία *RAS* γονίδια κωδικοποιούν για 4 υψηλής ομολογίας πρωτεΐνες 21kDa, την HRAS, την NRAS, την KRAS4A και την KRAS4B. Οι KRAS4A και KRAS4B προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Το αμινο-τελικό κομμάτι (αμινοξικά κατάλοιπα 1-165) των HRAS, KRAS και NRAS περιλαμβάνει μια υψηλά συντηρημένη G περιοχή, που έχει κοινή δομή. Οι πρωτεΐνες RAS διαφέρουν ουσιαστικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο, που είναι γνωστό ως υπερμεταβλητή περιοχή (hypervariable region). Αυτή η περιοχή αποτελείται από αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία καθορίζουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης, οι οποίες είναι απαραίτητες για την στόχευση των RAS πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (εικόνα Ε6).



**Εικόνα Ε6:** Οι τέσσερις ισομορφές των RAS [1]. Οι HRAS, NRAS, KRAS4A και KRAS4B έχουν μεγάλο βαθμό ομολογίας στην G περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 1-165). Τα πρώτα 85 αμινοξικά κατάλοιπα είναι ταυτόσημα και για τις 4 πρωτεΐνες και καθορίζουν την πρόσδεση στην διφωσφορική (GDP) και τριφωσφορική (GTP) γουανοσίνη. Σε αυτά περιλαμβάνονται η περιοχή πρόσδεσης των φωσφορικών (P loop) και οι διακόπτες I και II, που ρυθμίζουν την πρόσδεση των RAS με μόρια-ρυθμιστές και -τελεστές. Τα επόμενα 80 αμινοξικά κατάλοιπα παρουσιάζουν ομολογία ~85-90%. Η καρβοξυ-τελική υπερμεταβλητή περιοχή καθορίζει τον μεμβρανικό εντοπισμό μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

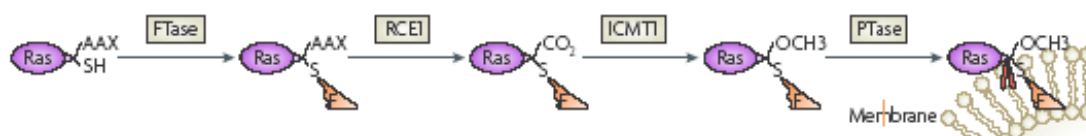
Μελέτες γενετικής σε ποντίκια προτείνουν ότι οι RAS πρωτεΐνες έχουν μοναδικούς αλλά και επικαλυπτόμενους ρόλους στην ανάπτυξη. Η KRAS είναι απαραίτητη για την εμβρυική ανάπτυξη των ποντικών [121], [122]. Ποντίκια στα οποία λείπει η KRAS πρωτεΐνη, πεθαίνουν από αναιμία και ελαττωματική εμβρυική ηπατική ερυθροποίηση την 12η-14η μέρα της κυοφορίας [121], [123]. Αντίθετα, ποντίκια στα οποία απουσιάζουν οι πρωτεΐνες HRAS και NRAS, χωριστά ή σε συνδυασμό, αναπτύσσονται φυσιολογικά και είναι βιώσιμα και γόνιμα [124], [125]. Συνδυάζοντας τις παρατηρήσεις σε ασθενείς και τις στοχευμένες γενετικές μελέτες σε ποντίκια, προκύπτει ότι οι HRAS, KRAS και NRAS έχουν τόσο μοναδικούς όσο και κοινούς ρόλους στην ανάπτυξη και ομοιόσταση των ιστών.

Οι διαφορές στην υπερμεταβλητή περιοχή των αλληλουχιών των RAS πρωτεϊνών καθορίζουν τις διαφορές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους, τη μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο, την εντόπισή τους (αλληλεπίδρασή τους με την κυτταρική μεμβράνη) και τελικά τις διαφορές τους στις βιολογικές δραστηριότητες που καθορίζονται από τον συνεντοπισμό τους με μόρια που ρυθμίζουν την ενεργότητά τους, όπως οι GAPs και οι GEFs καθώς και με μόρια που αλληλεπιδρούν ανοδικά, όπως οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) και οι υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCRs), αλλά και καθοδικά όπως η PI3K. Τα μέλη της οικογένειας RAS, για καιρό θεωρούνταν ότι ήταν όμοια λειτουργικά εξαιτίας της υψηλής ομοιότητας των αλληλουχιών τους, της κοινής αναγκαιότητας για «αγκυροβολήση» στην κυτταρική μεμβράνη και της βιοχημικής τους συγγένειας για κοινά μόρια-τελεστές *in vitro*. Στην πραγματικότητα, εμφανίζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές που προκύπτουν από διαφορές στη μεταφορά τους, τον εντοπισμό τους και ανάλογες λειτουργίες που αποδίδονται στη διαφορετική επεξεργασία τους [126].

## 1.6. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά την μετάφραση στα ριβοσώματα, όλα τα μέλη της οικογένειας RAS υφίστανται μια ομάδα κοινών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια RAS φαρνεσυλιώνονται ή γερανυλιώνονται στην κυστεΐνη του καρβοξυ-τελικού CAAX μοτίβου από το ένζυμο φαρνεσυλ-τρανφεράση (FTase), οδηγώντας τις πρωτεΐνες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση του

–AAX μοτίβου από μια ενδοπεπτιδάση, ένζυμο-μετατροπέα της RAS (RceI), ακολουθούμενη από καρβοξυμεθυλίωση του καρβοξυ-τελικού καταλοίπου της κυστεΐνης από το ένζυμο καρβοξυμεθυλτρανσφεράση 1 της ισοπρενυλκυστεΐνης (Icmt1) [127], [128], [129], [130] (εικόνα E7).



**Εικόνα E7:** Κατεργασία του καρβοξυ-τελικού άκρου των RAS πρωτεϊνών. Μία φαρνεσουλ-πυροφωσφορική ομάδα προστίθεται στα νεοσυντιθέμενα μόρια ras από το ένζυμο φαρνεσουλ-τρανσφεράση (FTάση). Στη συνέχεια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο αποκόπτονται με πρωτεόλυση τα τρία τελευταία αμινοξέα από την RCEI και καρβοξυμεθυλιώνεται το κατάλοιπο της κυστεΐνης (ICMT1) [2].

Στη συνέχεια, ακολουθεί περαιτέρω επεξεργασία, καθώς οι πρωτεΐνες διέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ειδικά, η δεύτερη σειρά γεγονότων επεξεργασίας συμβαίνει σε άλλα κατάλοιπα κυστεΐνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση της NRAS, το κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 181 παλμιτοϋλιώνεται ενώ στην περίπτωση της HRAS παλμιτοϋλιώνονται δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στις θέσεις 181 και 184 [126]. Για τις HRAS και NRAS, αυτές οι τροποποιήσεις χρησιμεύουν ως το «δεύτερο σήμα» που κατευθύνει την περαιτέρω μεταφορά τους στο εξωκυττικό μονοπάτι.

Οι πρωτεΐνες HRAS και NRAS που είναι μεταλλαγμένες σε αυτές τις θέσεις κυστεΐνης σταματούν στις εσωτερικές μεμβράνες και δεν μεταφέρονται περαιτέρω [131]. Η KRAS4B δεν υφίσταται παλμιτοϋλίωση, αλλά πιθανόν η μεταφορά της και η «αγκυροβόλησή» της στην κυτταρική μεμβράνη στηρίζεται στην πολυβασική περιοχή της υπερμεταβλητής περιοχής της, που αποτελείται από μια αλυσίδα καταλοίπων λυσίνης. Οι πλήρως τροποποιημένες HRAS και NRAS μεταφέρονται μέσω των κυστιδίων που «εκβλαστάνουν» από τη συσκευή Golgi στην κυτταρική μεμβράνη. Σε συνθήκες όπου η «εκβλάστηση» των κυστιδίων του Golgi σταματά ( $16^{\circ}\text{C}$ ), οι HRAS και NRAS σταματούν στις εσωτερικές μεμβράνες [132]. Η πολυβασική περιοχή της KRAS4B λειτουργεί έτσι ώστε να κατευθύνει την πρωτεΐνη σε διαφορετικό μονοπάτι μεταφοράς, το οποίο φαίνεται να εξαρτάται από τους μικροσωληνίσκους. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τμήματα της υπερμεταβλητής περιοχής της KRAS4B προσδένουν τους μικροσωληνίσκους όπου δεν είναι εφικτός ο



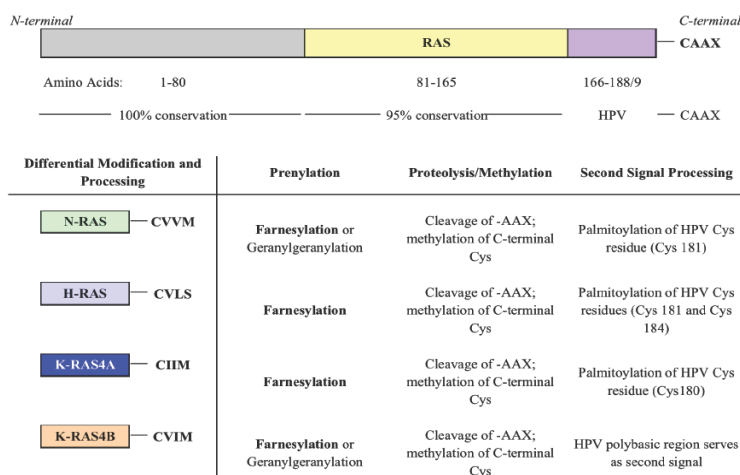
σηματισμός κυστιδίων χωρίς, παρόλα αυτά, να εμποδίζεται η μεταφορά της. Η KRAS4B προσδένει, *in vitro*, σε ακινητοποιημένους από taxol μικροσωληνίσκους, με τρόπο που εξαρτάται από την κατάλληλη σύνθεση και τροποποίηση της πολυβασικής περιοχής [133]. Παρόλο που λεπτομέρειες για το σύστημα μεταφοράς των μικροσωληνίσκων δεν είναι γνωστές, κατεργασία των κυττάρων με taxol επιλεκτικά εμποδίζει το σωστό εντοπισμό των νεοσυντιθέμενων μορίων KRAS4B [134]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος KRAS4A περιέχει υπερμεταβλητή αλληλουχία που στερείται την πολυβασική περιοχή της KRAS4B αλλά κατέχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 181, το οποίο είναι υπόστρωμα παλμυτουλίωσης και, ως συνέπεια, μεταφέρεται μέσω του συστήματος των κυστιδίων. Από βιολογικής άποψης, η KRAS4A είναι πιο όμοια με την HRAS στην ικανότητα μετασχηματισμού των κυττάρων και στην πρόκληση κυτταρικής μετανάστευσης από ό,τι η KRAS4B [135].

Η μετα-μεταφραστική προσθήκη λιπιδίων στις πρωτεΐνες RAS βρέθηκε ότι είναι καθοριστικής σημασίας για τη λειτουργία τους. Μια αρχική μελέτη σε αυτό το πεδίο, δημοσιεύθηκε το 1982, υποδεικνύοντας ότι η ώριμη μορφή της ικκής πρωτεΐνης HRAS εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη [136]. Μερικούς μήνες αργότερα αποδείχθηκε ότι η ικκή HRAS παλμιτουλιώνεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο, με το προσαρτημένο λιπίδιο να διευκολύνει την επαφή με τη μεμβράνη [137]. Η λειτουργική συσχέτιση μεταξύ της λιπιδικής τροποποίησης και της λειτουργίας της RAS έγινε από την ομάδα του Douglas Lowry το 1984, η οποία έδειξε ότι η πρόσδεση του λιπιδίου και η επαφή με τη μεμβράνη είναι απαραίτητα για την μετασχηματιστική δράση της ικκής HRAS ογκοπρωτεΐνης [138], [139]. Δουλεύοντας με την κυτταρική HRAS, η ομάδα του Stuart Aaronson απέδειξε ότι αυτή η τροποποίηση του καρβοξυτελικού άκρου και η προσέλκυση της RAS στην μεμβράνη είναι μια προϋπόθεση για την βιοχημική ενεργοποίησή της [140].

Οι μοριακοί μηχανισμοί της πρόσδεσης λιπιδίων στην πρωτεΐνη RAS διαλευκάνθηκαν τα επόμενα 5 χρόνια μέσω μιας σειράς παρατηρήσεων χρησιμοποιώντας γενετική ζυμομύκητα, πρωτεϊνική βιοχημεία και *in vitro* κυτταρικά συστήματα [141], [142], [143], [144], [145], [146].

Αναστολείς της φαρνεσυλτρανσφεράσης έχουν αναπτυχθεί ως πιθανή θεραπεία για τον καρκίνο με βάση τα δεδομένα που δείχνουν ότι η μετα-μεταφραστική διαδικασία από τις πρενυλ-τρανσφεράσες είναι απαραίτητη για τη βιολογική δραστηριότητα των

φυσιολογικών και των ογκογενών RAS πρωτεϊνών [147]. Παρόλα αυτά, οι KRAS και NRAS διαφεύγουν τη λειτουργική αδρανοποίηση με το να υπόκεινται σε γερανυλ-γερανυλίωση, κάτι το οποίο πιθανόν εξηγεί την απογοητευτική κλινική αποτελεσματικότητα αυτών των αναστολέων [148]. Στην **εικόνα Ε8** αποδίδονται συνοπτικά οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των τεσσάρων ισομορφών των RAS πρωτεϊνών.



**Εικόνα Ε8:** Σύνοψη της ομολογίας των μελών της οικογένειας RAS και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [3]

## 1.7. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ RAS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Οι διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των μελών της οικογένειας RAS παίζουν σημαντικό ρόλο στο πώς και πού μπορούν να εντοπιστούν στην κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από ένα δυναμικό πολύπλοκο μωσαϊκό διαφορετικών λιπιδικών και πρωτεϊνικών συστατικών. Η σημαντικότητα της ετερογένειας της κυτταρικής μεμβράνης για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών RAS και συνεπώς και για τη λειτουργία τους, είναι ένα ενεργό και καινοτόμο πεδίο έρευνας, το οποίο έχει ήδη αποδειχθεί σημαντικό στον καθορισμό των διακριτών λειτουργικών ταυτοτήτων των διαφόρων μελών της οικογένειας RAS [149], [150], [151].

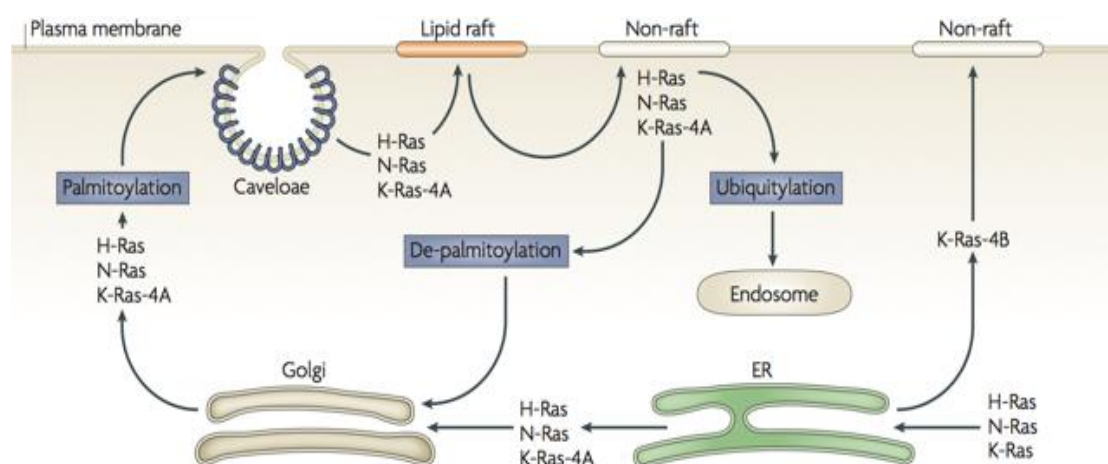
Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών RAS μέσα στη μεμβράνη αλλάζει επίσης ανάλογα με το αν το μόριο βρίσκεται στην ενεργή ή ανενεργή μορφή. Η HRAS στην ανενεργή της

μορφή βρίσκεται κυρίως σε σχεδίες λιπιδίων (lipid rafts) πλούσιες σε χοληστερόλη καθώς και σε εγκολπώσεις της κυτταρικής μεμβράνης (caveolae) στις οποίες εντοπίζεται σημαντικός αριθμός μεμβρανικών υποδοχέων [152]. Ενεργοποίηση της HRAS την οδηγεί σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμη ως προς τη σύστασή τους σε συγκεκριμένα λιπίδια ή πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η ικανότητα της HRAS να απομακρύνεται από τις σχεδίες λιπιδίων εξαρτάται από την ύπαρξη της περιοχής σύνδεσης της υπερμεταβλητής δομής (αμινοξικά κατάλοιπα 166-179) [153]. Οι μεταλλαγμένες μορφές HRAS<sup>V12</sup> που στερούνται αυτή την περιοχή σύνδεσης, δεν μπορούν να μεταναστεύσουν από τις σχεδίες λιπιδίων παρά την συνεχώς ενεργή κατάστασή τους [152].

Ενώ η HRAS εξέρχεται από τις πλούσιες σε χοληστερόλη σχεδίες λιπιδίων μετά την ενεργοποίησή της, απαιτεί ταυτόχρονα χοληστερόλη για να ενεργοποιήσει, με τον σωστό τρόπο, μόρια-τελεστές. Μείωση της χοληστερόλης από τις κυτταρικές μεμβράνες, είτε χημικά (π.χ. με χρήση κυκλοδεξτρίνης) είτε με την έκφραση επικρατών μεταλλαγμένων μη λειτουργικών μορφών καβεολίνης που δεν μπορούν να διακινήσουν σωστά τη χοληστερόλη, αυξάνει την πλευρική κινητικότητα της HRAS μέσα στην μεμβράνη και παρεμποδίζει τη λειτουργία της. Παρόλο που η HRAS διατηρεί την ικανότητά της να στρατολογεί την RAF (βλέπε σελ. 28) σε κυτταρικές μεμβράνες με μειωμένη χοληστερόλη, δεν μπορεί να την ενεργοποιήσει [154].

Αυτή η παρατήρηση αφορά ειδικά την HRAS. Η KRAS4B σηματοδοτεί και μεταναστεύει χωρίς να επηρεάζεται από το περιεχόμενο της μεμβράνης σε χοληστερόλη. Η KRAS4B έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει στις σχεδίες λιπιδίων, στις οποίες η HRAS συσσωρεύεται [149]. Η NRAS, όπως και η HRAS, εντοπίζεται στις σχεδίες λιπιδίων, αλλά δεν συνδέεται με τις εγκολπώσεις της κυτταρικής μεμβράνης (caveolae) [155]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει δύο πιθανά μοντέλα για τη σχέση των RAS πρωτεϊνών και της ετερογενούς κυτταρικής μεμβράνης: (1) **εντοπισμός σε μικροδομές** της κυτταρικής μεμβράνης, στις οποίες τα μέλη της οικογένειας RAS οδηγούνται και προσαρτούνται, με κριτήριο τον χώρο και τη σύσταση συγκεκριμένων μικροδομών, ή (2) **προσβασιμότητα σε μικροδομές**, στις οποίες τα μόρια RAS δεν στοχεύουν την κυτταρική μεμβράνη αλλά διαφέρουν στην ελευθερία με την οποία διαχέονται πλευρικά σε αυτή και έτσι προσεγγίζουν τις διάφορες μικροδομές που θα τα συμπεριλάβουν [154]. Ο εναλλασσόμενος εντοπισμός της HRAS, όπως υπαγορεύεται από την ενεργή ή την ανενεργή μορφή

της, υποστηρίζει και τα δύο μοντέλα, όπου η χημική σύσταση και η διαμόρφωση των καρβοξυ-τελικών άκρων της HRAS και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της καθορίζουν τη συγγένεια με τη συγκεκριμένη λιποπρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης. Σε ποικίλες διαμορφώσεις, και σε συνάρτηση με διάφορους προσδέτες, αυτή η συγγένεια μπορεί να αλλάξει, επηρεάζοντας την πρόσβαση του μορίου σε περιοχή της μεμβράνης με διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Στην **εικόνα Ε9** παρουσιάζεται η ανακύκλωση των RAS πρωτεϊνών [2].



**Εικόνα Ε9:** Ανακύκλωση των RAS πρωτεϊνών. Οι κυτταροπλασματικές RAS μεταφέρονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου όπου επεξεργάζονται μετα-μεταφραστικά από την φαρνεσυλ-τρανσφεράση. Η φαρνεσυλιωμένη KRAS4B μεταφέρεται κατευθείαν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω άγνωστου μηχανισμού, ενώ οι H-, N- και KRAS4A μεταβαίνουν μέσω της συσκευής Golgi και υφίστανται παλμιτοϋλίωση πριν εγκατασταθούν στις πλούσιες με χοληστερόλη εγκοιλώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Επαρκής ενεργοποίηση αυτών των RAS πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει τον εντοπισμό τους σε πιο ειδικές μικροπεριοχές της μεμβράνης για να στρατολογήσουν μόρια-τελεστές. Η H- και η NRAS ενδοκυτώνονται και απο-παλμιτυλιώνονται και επιστρέφουν πίσω στη συσκευή Golgi, όπου ανακυκλώνονται. Οι ουβικουτινωμένες H- και NRAS που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οδηγούνται στα ενδοσώματα [2].

Έχουν επίσης παρουσιαστεί μελέτες για τον μεμβρανικό εντοπισμό πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν τη λειτουργία των RAS. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση με την galectin-1 σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της ενεργούς H-RAS με τις μικροδομές που δεν περιέχουν σχεδίες λιπιδίων [151]. Αυτή η αλληλεπίδραση παρατείνει τη δραστηριότητα της RAS ως απόκριση στη διέγερση με EGF και κατευθύνει την ενεργοποιημένη RAS να αλληλεπιδράσει επιλεκτικά με την

Raf αλλά όχι με την PI3K [156]. Η galectin-3 συμμετέχει σε μια παρόμοια αλληλεπίδραση αλλά αποκλειστικά με την KRAS4B και εξασθενεί τη σηματοδότηση της RAS προς τα μόρια-τελεστές [157].

Ο αριθμός και η θέση των αμινοξικών καταλοίπων που παλμιτοϋλιώνονται προσδίδουν εξειδίκευση στην διακίνηση καθώς και τον εντοπισμό των RAS πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η αγρίου τύπου HRAS, η οποία υπόκειται σε παλμιτοϋλίωση στα κατάλοιπα κυστεΐνης στις θέσεις 181 και 184, όταν παλμιτοϋλιώνεται μόνο στην κυστεΐνη 181 (η κυστεΐνη 184 έχει μεταλλαχθεί σε σερίνη) διακινείται με παρόμοιο τρόπο με την αγρίου τύπου και εμφανίζει έντονο εντοπισμό στη συσκευή Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, παλμιτοϋλίωση μόνο στην κυστεΐνη 184 (η κυστεΐνη 181 έχει μεταλλαχθεί σε σερίνη), οδηγεί σε συσσώρευση της HRAS στη συσκευή Golgi, με ελάχιστο εντοπισμό στην κυτταρική μεμβράνη, υποδηλώνοντας ότι αυτή η πρενυλίωση είναι απαραίτητη για τη σωστή μεταφορά της HRAS ή την παραμονή της στην κυτταρική μεμβράνη [131]. Δεδομένης της εξειδίκευσης του μηχανισμού μεταφοράς και εντοπισμού των RAS πρωτεϊνών που προκύπτει από τα παραπάνω γεγονότα πρενυλίωσης, ο ανωτέρω περιγραφόμενος μηχανισμός παλίνδρομης μεταφοράς εμποδίζει τα μόρια των RAS πρωτεϊνών στο να εντοπίζονται μη ειδικά σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, όταν αποακυλιώνονται [158].

Εκτός από τους λειτουργικούς πληθυσμούς των RAS πρωτεϊνών που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, ώριμα, λειτουργικά RAS μόρια υπάρχουν στις εσωτερικές μεμβράνες του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi [132] όπου προσδένουν και σηματοδοτούν μόρια-τελεστές. Πώς αυτός ο πληθυσμός που βρίσκεται στις εσωτερικές μεμβράνες σχετίζεται με τα μόρια που κατευθύνονται προς την κυτταρική μεμβράνη παραμένει άγνωστο. Φαίνεται πάντως ότι η αναστρεψιμότητα της παλμιτοϋλίωσης είναι πιθανόν ένα σημαντικό γεγονός στην κυκλοφορία των RAS μορίων μέσα, έξω και μεταξύ των μεμβρανών. Η φαρνεσυλίωση από μόνη της έχει δείχθει ότι είναι ανεπαρκής να αγκυροβολήσει τις πρωτεΐνες στη λιπιδική διπλοστιβάδα και ένα νέο μοντέλο ρύθμισης των RAS που προσδίδει μεγάλη βαρύτητα στην αναστρεψιμότητα του «δεύτερου σήματος» γεγονότων παλμιτοϋλίωσης που υφίστανται οι NRAS και HRAS έχει αρχίσει να εμφανίζεται [146], [158]. Οι παλμιτοϋλιωμένες RAS πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη χάνουν τον σύνδεσμο με την διπλοστιβάδα λιπιδίων, με απώλεια των

παλμιτουϊλιωμένων καταλοίπων που διακινούνται με αντίστροφο τρόπο από την κυτταρική μεμβράνη στη συσκευή Golgi. Εκεί συναντούν τις παλμιτουϊλ-τρανσφεράσες, ανακτούν τις τροποποιήσεις τους και επανέρχονται στο εξωκρινές μονοπάτι μεταφοράς από τη συσκευή Golgi στην κυτταρική μεμβράνη [159]. Βάσει του διαφορετικού βαθμού παλμιτουϊλίωσης αυτών των πρωτεϊνών (η NRAS υφίσταται παλμιτουϊλίωση σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης ενώ η HRAS σε δύο), αυξάνεται η πιθανότητα οι σημαντικές αυτές διαφορές να έχουν αντίκτυπο στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Εφόσον ο ρυθμός απώλειας της παλμιτουϊλίωσης καθορίζει την έκταση παραμονής στην κυτταρική μεμβράνη, η HRAS ανακυκλώνεται περίπου με τον μισό ρυθμό της NRAS και παραμένει για μεγαλύτερο διάστημα στη μεμβράνη, μια διαφορά που μπορεί να επηρεάσει τη διαθεσιμότητά τους στα μόρια-τελεστές και τα ρυθμιστικά μόρια που έπονται της ενεργοποίησης. Επίσης, καθώς τα μόρια αυτά χάνουν την παλμιτουϊλίωσή τους και ξεκινούν την αντίστροφη πορεία προς το Golgi, μπορεί να μεταφέρονται στην ενεργή τους μορφή ή να έχουν προσδέσει μόρια-τελεστές, παρέχοντας έναν πιθανό μηχανισμό εντοπισμού ενεργών μορίων RAS και ενεργών συμπλεγμάτων σηματοδότησης στις εσωτερικές μεμβράνες του κυττάρου.

Η KRAS4B περιέχει οκτώ κατάλοιπα λυσίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της, τα οποία προσφέρουν ένα θετικό φορτίο, ικανό για ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τις αρνητικά φορτισμένες κεφαλές των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η αλληλεπίδραση διαφέρει από τη φυσική αλληλεπίδραση που εμφανίζεται στην περίπτωση των HRAS και NRAS, οι οποίες αγκυροβολούν μέσα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των παλμιτουϊλίων της υπερμεταβλητής περιοχής και υπόκεινται σε ένα τελείως διαφορετικό σύστημα ρύθμισης. Τα άλλα δύο κατάλοιπα του πολυβασικού μοτίβου της KRAS4B, η σερίνη 181 και η θρεονίνη 183 αποτελούν υποστρώματα για φωσφορυλίωση από την PKC (με την σερίνη 181 να είναι η κύρια θέση φωσφορυλίωση). Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης αυτών των καταλοίπων είναι να εξουδετερώνει το θετικό φορτίο των βασικών καταλοίπων και να διακόπτει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της KRAS4B με την αρνητικά φορτισμένη λιπιδική διπλοστιβάδα, με ένα μηχανισμό που περιγράφεται ως «φαρνεσυλ-ηλεκτροστατικός» διακόπτης. Αυτό οδηγεί στην «εσωτερίκευση» (internalization) της KRAS4B [160].

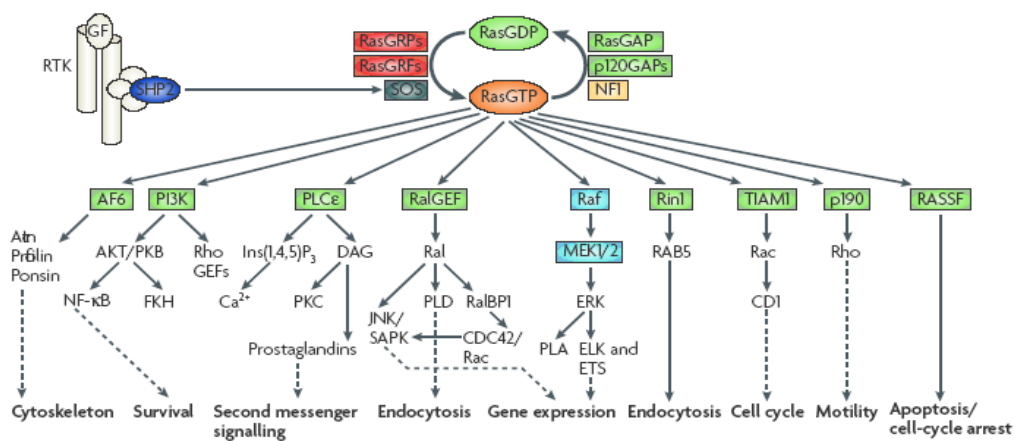
## 1.8. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Οι πρωτεΐνες RAS ρυθμίζουν την απόκριση του κυττάρου σε πολλά εξωκυττάρια ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών αυξητικών παραγόντων. Η πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί αλλαγές στην ενδοκυττάρια διαμόρφωσή τους ώστε να αλληλεπιδρούν με μόρια-προσαρμοστές και πρωτεΐνες-διακόπτες σήματος. Ανάμεσα σε αυτά είναι και παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs), όπως είναι τα μέλη της οικογένειας SOS. Οι παράγοντες αυτοί εκτοπίζουν τα νουκλεοτίδια γουανίνης και επιτρέπουν παθητική πρόσδεση του GTP, το οποίο είναι σε περίσσεια στο κυτταρόπλασμα σχετικά με το GDP. Οι RAS-GTP πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν παραγωγικά με πάνω από 20 τελεστές, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης RAF, της PI3K και της RALGDS, προκειμένου να ρυθμίσουν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η διαφοροποίηση [161], [162]. Ο βαθμός και η διάρκεια της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης RAS μπορεί να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στις αποφάσεις για την τύχη του κυττάρου. Για παράδειγμα, στα PC12 κύτταρα αδενοφαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου, παροδική ενεργοποίηση της RAS μέσω σηματοδότησης από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα δραστηριοποιεί τον πολλαπλασιασμό, ενώ η συνεχής ενεργοποίηση της RAS από τον νευρο-αυξητικό παράγοντα επάγει τη διαφοροποίηση [163], [164], [165], [166], [167]. Οι πρωτεΐνες RAS ρυθμίζονται αρνητικά από τις πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη GTPάση (GAPs) σταθεροποιώντας την υψηλής ενέργειας μεταβατική κατάσταση κατά την αντίδραση υδρόλυσης της RAS-GTP.

Μέχρι σήμερα, οι προσπάθειες να αναπτυχθούν θεραπείες που στοχεύουν τις πρωτεΐνες RAS είχαν μικρή επιτυχία και οι ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στα μόρια που ενεργοποιούνται από τις RAS. Αρχικές μελέτες αποκάλυψαν ότι συνήθως οι RAS σηματοδοτούν μέσω ενός περιορισμένου αριθμού μονοπατιών, συχνά με διαφορετικό βιολογικό αποτέλεσμα. Μεταγενέστερη δουλειά έδειξε ένα πιο εκτεταμένο σύνολο μορίων-τελεστών και σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τις RAS, το οποίο συνεχώς μεγαλώνει και θα βοηθήσει, χωρίς αμφιβολία, στην περαιτέρω κατανόηση του ποικίλου εύρους αποτελεσμάτων που έχει η σηματοδότηση των RAS μέσα στο κύτταρο [118], [168].

Μόριο-τελεστής θεωρείται μια πρωτεΐνη με ισχυρή προσδετική ικανότητα στην ενεργή μορφή της RAS και της οποίας η πρόσδεση επηρεάζεται από μεταλλάξεις στην κύρια περιοχή αλληλεπίδρασης των RAS με τα μόρια-τελεστές (κατάλοιπα 32-40). Επιπλέον, η λειτουργία του μορίου-τελεστή θα πρέπει να ρυθμίζεται από την αλληλεπίδρασή του με τη RAS, για παράδειγμα από αλλαγές (1) στον υποκυτταρικό εντοπισμό του τελεστή (στρατολόγηση), (2) στην εγγενή καταλυτική δραστηριότητα (αλλοστερική ρύθμιση) ή (3) στην αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά του μονοπατιού σηματοδότησης (σχηματισμός συμπλέγματος). Επίσης, η βιολογική δραστηριότητα της RAS θα πρέπει να εξαρτάται από τη λειτουργία του μορίου-τελεστή, κάτι που επιβεβαιώνεται από διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις, όπως μορφές των RAS μεταλλαγμένες στην περιοχή πρόσδεσης των τελεστών, φαρμακευτικούς αναστολείς της λειτουργίας των μορίων-τελεστών και κύτταρα που δεν εκφράζουν μόρια-τελεστές, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (siRNA) και στοχεύοντας γενετικά τα μόρια-τελεστές [162].

Τα επιβεβαιωμένα καθώς και τα φερόμενα ως μόρια-τελεστές χαρακτηρίζονται από μια περιοχή πρόσδεσης των RAS. Τουλάχιστον τρεις διακριτές αλληλουχίες των 100 αμινοξικών καταλοίπων έχουν ταυτοποιηθεί. Τέτοιες είναι: η περιοχή πρόσδεσης των RAS (RAS-binding domain, RBD) στις πρωτεΐνες RAF ή Tiam1, οι περιοχές πρόσδεσης των RAS που βρίσκονται στις κινάσες των 3-φωσφοϊνοσιτιδίων τάξης I (PI3K-RBD) και οι περιοχές που σχετίζονται με τις RAS (RA, αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως ομόλογη αλληλουχία στις RalGDS και AF-6) και βρέθηκαν στην πλειοψηφία των μορίων-τελεστών των RAS [169], αλλά και σε πολλές πρωτεΐνες που δεν έχουν παρατηρηθεί να αλληλεπιδρούν με τις RAS (εικόνα E10).



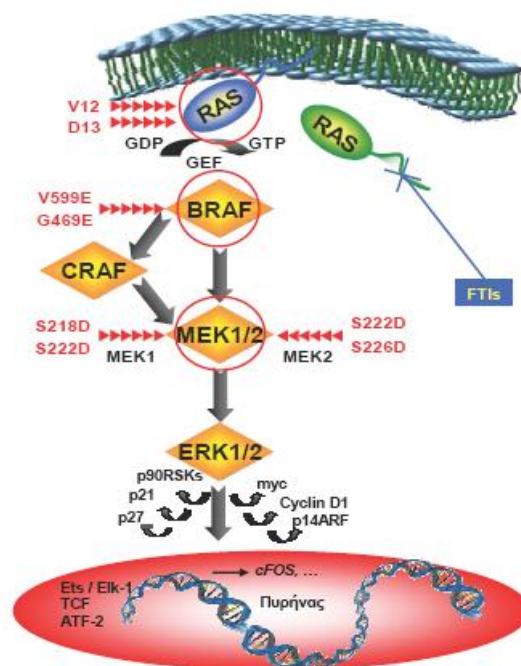
**Εικόνα E10:** Το δίκτυο σηματοδότησης των RAS πρωτεϊνών [2]



Η ικανότητα των συνεχώς ενεργών, μεταλλαγμένων μορφών των RAS να προκαλούν κυτταρικό μετασχηματισμό έχει αποτελέσει τη βάση εκτεταμένων μελετών των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τις RAS. Η RAS επάγει ποικιλοτρόπως τον κακοήγη μετασχηματισμό, και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να μελετήσουν αυτό το φαινόμενο δίνουν συνήθως μονομερείς απαντήσεις. *In vitro*, χρησιμοποιούνται δοκιμασίες προσδιορισμού του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων, του μορφολογικού τους μετασχηματισμού και της ικανότητάς τους να μεγαλώνουν σε μαλακό άγαρ. *In vivo*, περιλαμβάνουν τη μέτρηση του σχηματισμού όγκων, της διείσδυσης, της αγγειογένεσης, της ικανότητας σχηματισμού όγκων σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια και της μετάστασης. Ο προσδιορισμός της συμμετοχής κάθε ενός μορίου-τελεστή ξεχωριστά στα φαινόμενα αυτά είναι δύσκολος, δεδομένου ότι υπάρχουν ελάχιστα μόρια-τελεστές που είναι επαρκή και αποτελεσματικά από μόνα τους στην επίτευξη του μετασχηματισμού μέσω των RAS. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι RAS σηματοδοτούν μέσω πολλαπλών μορίων-τελεστών για να επιτύχουν το μετασχηματισμό.

### 1.8.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ

Τα περισσότερο μελετημένα μόρια-τελεστές των RAS είναι οι RAF κινάσες σερίνης/θρεονίνης [170]. Παρόλο που τα προϊόντα των τριών *RAF* γονιδίων (*A-RAF*, *B-RAF*, *C-RAF-1*) έχουν παρόμοια αλληλουχία, συμπεριλαμβανομένης μιας ομόλογης περιοχής που προσδένει τις RAS στην NH<sub>2</sub>-τελική ρυθμιστική περιοχή της πρωτεΐνης, παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης, διακριτούς ρόλους στην ανάπτυξη και σημαντικές βιοχημικές και λειτουργικές



**Εικόνα E11:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK

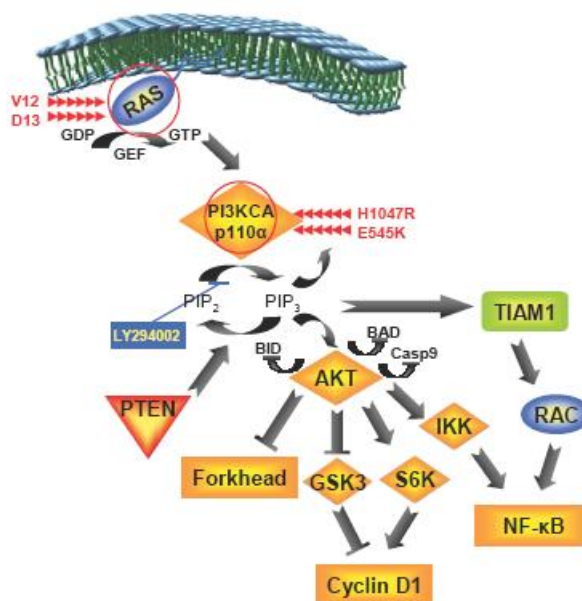
διαφορές [171]. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλή ενεργότητα κινάσης της B-RAF, σε συνδυασμό με τις ελάχιστες απαιτήσεις για ενεργοποίηση, παρέχουν τη βάση για τις ογκογόνες ιδιότητες των μεταλλαγμένων μορφών B-RAF. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της διαφοράς είναι το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τη C-RAF-1, που απαιτεί τέσσερα γεγονότα φωσφορυλίωσης για να αποκτήσει πλήρη ενεργότητα κινάσης, η B-RAF απαιτεί μόνο δύο [172]. Η πρόσφατη ταυτοποίηση μεταλλαγμένων μορφών της B-RAF σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκίνων αποτελεί περαιτέρω επιβεβαίωση της σημασίας αυτού του μονοπατιού στην ογκογένεση μέσω RAS [31]. Η RAS προάγει τη σύνδεση της RAF με την κυτταρική μεμβράνη, όπου άλλα γεγονότα διευκολύνουν την ενεργοποίησή της. Στη συνέχεια, η raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις κινάσες διπλής ενεργότητας, MEK1 και MEK2. Οι MEK1/2 είναι κινάσες των κινασών ERK1 και ERK2 που ενεργοποιούνται από μιτόγονα (mitogen-activated protein kinases – MAPKs). Οι ενεργοποιημένες MAP κινάσες μετατοπίζονται στον πυρήνα [173], όπου ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση ελέγχοντας μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων της οικογένειας Ets [174], [175] (**εικόνα E11**).

Το 1998 βρέθηκε ότι η ενεργοποιημένη HRAS μπορεί να επάγει την ανάπτυξη όγκων όταν NIH3T3 κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές του ογκογονιδίου εμφυτευθούν υποδόρια σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια [176]. Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές στη περιοχή πρόσδεσης των μορίων-τελεστών (effector domain mutants) της ενεργοποιημένης HRAS προκαλούν ανάπτυξη όγκων, ανεξάρτητα από το μονοπάτι που ενεργοποιούν, υποδηλώνοντας ότι η ογκογένεση μπορεί να είναι εξαρτώμενη ή μη από τις RAF. Όταν NIH3T3 κύτταρα που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή T35S των RAS, ειδική για την ενεργοποίηση του RAF μονοπατιού, ενέθηκαν σε ποντίκια, εμφανίστηκε το ίδιο φαινόμενο μετάστασης στους πνεύμονες όπως με τα κύτταρα που εκφράζουν την HRAS<sup>V12</sup>. Σε αντίθεση, κύτταρα που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές Y40C ή E37G, ειδικές για την ενεργοποίηση των μονοπατιών της PI3K και της RalGEF αντίστοιχα, δεν εμφάνισαν ανάπτυξη μετάστασης για χρονικό διάστημα 14 εβδομάδων μετά την ένεση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μεταστατική νεοπλασία των μετασχηματισμένων από τη RAS NIH3T3 κυττάρων συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη RAF. Για την επιβεβαίωση της συμμετοχής των μορίων-τελεστών της RAF στην περιφερική εμφάνιση του όγκου, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα με κύτταρα που

εκφράζουν την *Mos*, μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τις MEK [177] ή με κύτταρα που εκφράζουν συνεχώς ενεργοποιημένη MEK [178] και βρέθηκε ότι σχηματίζονται και στις δύο περιπτώσεις μεταστάσεις στους πνεύμονες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που προέκυψαν από τους παραπάνω περιγραφέντες όγκους ενέθηκαν δευτερογενώς σε ποντίκια (*secondary xenografts*) και βρέθηκε ότι και οι τρεις μεταλλαγμένες μορφές ήταν σε θέση να προκαλέσουν μετάσταση στους πνεύμονες, παρόλο που τα κύτταρα που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές 12V/37G και 12V/40C παράγουν λιγότερους όζους από εκείνα που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή 12V/35S. Τα κύτταρα που προέκυψαν από τις PI3K- και Ral-ειδικές δευτερογενείς μεταστάσεις έδειξαν αύξηση των επιπέδων της *Met*, η οποία οδηγεί σε αυξημένη διείσδυση *in vitro* [179] επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η διείσδυση και η μετάσταση προκαλούνται από την ογκογόνο RAS μέσω μιας πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών.

### 1.8.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/AKT/mTOR

Ένα από τα πιο καλά μελετημένα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την ογκογόνο RAS είναι το μονοπάτι της κινάσης των 3-φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3K) [180], [181] (εικόνα E12). Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει το σηματοδοτικό μόριο 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>) σε 3,4,5-τριφωσφορική (PIP<sub>3</sub>). Στη συνέχεια, η PIP<sub>3</sub> ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt (ή πρωτεϊνική κινάση B). Ενεργοποίηση της Akt μέσω της RAS οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [182] και αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης, πιθανόν



Εικόνα E12: Το σηματοδοτικό μονοπάτι των RAS/PI3K

αμβλύνοντας τα αποπτωτικά σήματα [181]. Η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, που καταλύει την αποσφωσφορυλίωση της PIP<sub>3</sub>, ενισχύει τη σημαντική συνεισφορά της υπερενεργοποίησης της PI3K στην ανάπτυξη του καρκίνου [183]. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο *PI3KCA* που κωδικοποιεί για την p110α καταλυτική υπομονάδα της PI3K έχουν βρεθεί σε καρκίνους του παχέος εντέρου και άλλους [38] καθώς και μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το μονοπάτι αυτό [184]. Η Akt ενεργοποιείται αφού προσδεθεί στα φωσφολιπίδια (PIP<sub>3</sub>) και φωσφορυλιωθεί στη Thr308 από την PDK1 [185] και στο καρβοξυ-τελικό άκρο στη Ser473. Η μέχρι τώρα αναφερόμενη PDK2, υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της Akt στη Ser473, έχει βρεθεί ότι είναι το σύμπλοκο 2 του mTOR (mTORC2), που δεν ελέγχεται από τη ραπαμυκίνη και αποτελείται από τις πρωτεΐνες rictor και Sin1 [186], [187]. Η Akt φωσφορυλιώνει επίσης το σύμπλοκο 1 του mTOR (mTORC1) με κύριο συστατικό την πρωτεΐνη raptor [188]. Πιο συγκεκριμένα, η Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την TSC2, που είναι αναστολέας του mTORC1 [189].

Οι αλλαγές στην σταθερότητα της προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων αλλά και της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία φαίνεται να ελέγχονται, τουλάχιστον μερικώς, από το μονοπάτι της PI3K. Αύξηση της ενεργότητας της κινάσης αυτής στα MDA-MB 435 κύτταρα καρκινώματος του μαστού μέσω σηματοδότησης της ιντεγκρίνης αββ4 οδηγεί σε αύξηση της διείσδυσης, με μηχανισμό που εξαρτάται από την πρωτεΐνη Rac [190]. Η μετανάστευση αυτή διαμέσω του Matrigel βρέθηκε ότι δεν εξαρτάται από τις MAP κινάσες (καθοδικά του άξονα RAS-ERK) ούτε από την Akt ή την p70<sup>S6</sup> κινάση (καθοδικά του άξονα RAS-PI3K) [191]. Το γεγονός ότι το ενδοκυτταρικό τμήμα της β4 στερείται το μοτίβο YMXM πρόσδεσης στην p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K προϋποθέτει έναν «μεσολαβητή» ανάμεσα στην ιντεγκρίνη και την PI3K [192]. Εφόσον η β4 κυτταροπλασματική περιοχή έχει Shc μοτίβα, τα οποία προσελκύουν τις πρωτεΐνες-προσαρμοστές Grb2 και Sos1/2, εικάζεται ότι η διείσδυση που ρυθμίζεται από την ιντεγκρίνη μέσω της PI3K πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της RAS.

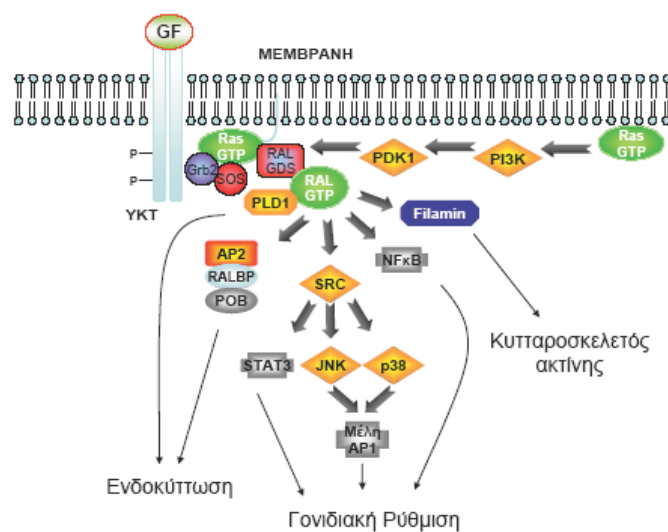
Μια βασική προϋπόθεση για την μετάσταση του καρκινικού κυττάρου είναι η ικανότητά του να μεταφέρεται από τον αρχικό όγκο, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου, σε απομακρυσμένα σημεία και δευτερογενώς να σχηματίζει νέο όγκο. Αυτό απαιτεί την ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να ξεφεύγει από την

απόπτωση που επάγεται μετά από αποκόλλησή του από την εξωκυττάρια ουσία [193]. Το μονοπάτι της PI3K/Akt έχει εμπλακεί σε αυτή τη διαδικασία, με την ογκογόνο RAS να προστατεύει τα MDCK κύτταρα από προγραμματισμένη απόπτωση που επάγεται από εναιώρηση [194]. Αυτή η αναστολή της απόπτωσης προσδίδει στο αποκολλημένο καρκινικό κύτταρο τη βιωσιμότητα κατά τη μετανάστευση προς περιφερικούς ιστούς.

Η PI3K ενεργοποιεί επίσης τους Rac GEFs (Sos, Vav) για να προάγει την ενεργοποίηση της Rac μικρής GTPάσης [195], [196]. Η Rac ρυθμίζει την αναδιοργάνωση της ακτίνης και της πτυχώσεις της μεμβράνης και μπορεί να προάγει την αύξηση της κινητικότητας του κυττάρου και να συμβάλλει στη διείσδυση και μετάσταση του καρκινικού κυττάρου [197].

### 1.8.3 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ RAL ΜΙΚΡΩΝ GTPΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ RALGEFS

Ένα ακόμη σηματοδοτικό μόριο καθοδικά της RAS και μέσα στην οικογένεια των μικρών GTPασών είναι η Ral [198] (εικόνα E13). Οι πρωτεΐνες RalA και RalB ενεργοποιούνται μετά από πρόσδεση της RAS στους RalGEFs (RalGDS, RGL, RGL2/Rlf, RGL3) και επακόλουθη ενεργοποίησή τους. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη σημαντικότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού των RalGEFs στην προαγωγή της ανεξάρτητης από την προσκόλληση (anchorage independent) ανάπτυξης των ανθρώπινων κυττάρων που επάγεται από την ογκογόνο RAS [199]. Αυτό το μονοπάτι εμπλέκεται επίσης στην πρόοδο της νεοπλασίας προς αδένωμα, καρκίνωμα και τελικά μετάσταση.



Εικόνα E13: Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/Ral

Η εκτοπική έκφραση διαφόρων μορφών της ογκογόνου RAS μπορεί να οδηγήσει σε περιφερική εμφύτευση και ανάπτυξη οξιδίων στους πνεύμονες, μετά από ένεση σε ποντίκια μετασχηματισμένων NIH3T3 κυττάρων [200]. Από αυτές μόνο η μεταλλαγμένη μορφή RAS<sup>V12</sup> ήταν ικανή να προκαλέσει μετάσταση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ενώ η RAS12V/37G, ειδική για την αποκλειστική ενεργοποίηση της Ral από τους RalGEFs μπορούσε επίσης να οδηγήσει σε μετάσταση, ο αριθμός των δευτερογενών όγκων μειωνόταν με την επαναφορά του μονοπατιού των ERK από μια ειδική φωσφατάση, την PAC1. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδιαφέροντα, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των ERK δεν βρίσκεται καθοδικά της RAS12V/37G. Η ανωτέρω μελέτη διερεύνησε τη φύση των μεταστάσεων που προκλήθηκαν από τη σηματοδότηση της ογκογόνου RAS και κατέληξε στο ότι ενώ ποικίλες μεταλλαγμένες μορφές της RAS και της RAF προκαλούν περιφερικούς όγκους στους πνεύμονες των ποντικών, τα κύτταρα που εκφράζουν την RAS12V/37G είναι πιο διεισδυτικά στον πνεύμονα και τους γειτονικούς ιστούς, με μικρότερη εστίαση (encapsulation) του όγκου. Υπήρχαν επίσης δευτερογενείς μεταστάσεις και αυτή η αύξηση της διεισδυτικότητας μειώθηκε στα κύτταρα που ταυτόχρονα εκφράζαν και την PAC1. Το μοντέλο αυτό δείχνει ότι η ενεργοποίηση των ERK είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και την πρόοδο των μεταστάσεων στους πνεύμονες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα που εκφράζουν ενεργοποιητές της Ral. Περαιτέρω *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η μετανάστευση και η διείσδυση αυτών των κυττάρων διαμέσω του Matrigel εξαρτώνται από την ενεργοποίηση των ERK [201].

#### **1.8.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RAS ΜΕ ΜΟΡΙΑ-ΤΕΛΕΣΤΕΣ**

Η αλληλεπίδραση των RAS πρωτεϊνών με τα μόρια-τελεστές τους δεν είναι απλά θέμα βιοχημικής συγγένειας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μέλη της οικογένειας RAS, όπως και πολλοί από τους τελεστές τους, έχουν μοναδικό ενδοκυτταρικό εντοπισμό και ο συνεντοπισμός αυτός καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αλληλεπίδρασή τους. Επιπλέον, πολλά από τα μόρια-τελεστές των RAS συνιστούν μέλη μεγαλύτερων οικογενειών, που μπορεί να παρουσιάζουν αλληλουχική απόκλιση στις περιοχές πρόσδεσης των RAS. Τρεις από τις πιο γνωστές οικογένειες μοριών-τελεστών των RAS αποτελούνται από πολλαπλές ισομορφές ή διακριτά μέλη. Για

παράδειγμα, η οικογένεια της PI3K τάξης I έχει τις ισομορφές p110α, p110β, p110γ και p110δ, η οικογένεια των RAF κινασών αποτελείται από την A-RAF, τη B-RAF και τη C-RAF-1, ενώ οι RalGEFs περιλαμβάνουν τους RalGDS, RGL, RGL2/Rlf και RGL3. Οι πρωτεΐνες RAS μπορεί να διαφέρουν στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν τις διαφορετικές ισομορφές ή τα μέλη της ίδιας οικογένειας και αυτές οι επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να έχουν σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις. Η ομολογία στην αλληλουχία και τη δομή όχι μόνο των RAS πρωτεϊνών αλλά και των περιοχών που προσδένουν τις RAS, σε συνδυασμό με τη συγγένεια των RAS προς τη μεμβράνη, προσδίδουν ένα αξιοσημείωτο εύρος στην επιλεκτικότητα των RAS και των μορίων-τελεστών.

Πολυάριθμες αναφορές περιγράφουν βιολογικές διαφορές που σχετίζονται με τη δράση διαφορετικών μελών της οικογένειας RAS προς τα ίδια μόρια-τελεστές ή λειτουργίες μοναδικές για κάποιο μέλος της οικογένειας RAS, αναδεικνύοντας την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων των RAS πρωτεϊνών με τα μόρια-τελεστές τους. Για παράδειγμα, είναι πολύ καλά θεμελιωμένο ότι τα μέλη της οικογένειας RAS, HRAS και KRAS4B αλληλεπιδρούν και τα δύο αλλά ενεργοποιούν με διαφορετικό τρόπο την κινάση σερίνης/θρεονίνης C-RAF-1 καθώς και την PI3K. Στα COS κύτταρα, όταν υπερεκφράζεται η συνεχώς ενεργή KRAS4B ενεργοποιείται πιο ισχυρά η C-RAF-1 συγκριτικά με όταν υπερεκφράζεται η συνεχώς ενεργή HRAS, όπως έδειξε *in vitro* μέτρηση της ενεργότητας της κινάσης, και επιπλέον προσελκύεται πιο αποτελεσματικά στην κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, υπερέκφραση της συνεχώς ενεργής HRAS αυξάνει την ενεργότητα της υπομονάδας p110 της κινάσης PI3K [202]. Παρόμοια, στα REF52 κύτταρα, η KRAS4B φαίνεται να ενεργοποιεί πιο ισχυρά την Rac1 απ' ό,τι η HRAS [203].

Παρόλο που όλα τα γνωστά μόρια-τελεστές πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τις RAS πρωτεΐνες μέσω της συντηρημένης δομής πρόσδεσης των μορίων-τελεστών (κατάλοιπα 32-40), υπάρχουν ιδιαιτερότητες σχετικά με την πρόσδεση του κάθε μορίου-τελεστή, οι οποίες έχουν διερευνηθεί για την καλύτερη κατανόηση της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών από τις RAS και το ρόλο τους σε κάθε δεδομένη βιολογική λειτουργία. Ειδικές μεταλλάξεις στον διακόπτη I της περιοχής πρόσδεσης των μορίων-τελεστών των RAS οδηγούν σε πρωτεΐνες ικανές να προσδέσουν περιορισμένο εύρος μορίων-τελεστών. Η μετάλλαξη T35S παράγει μια RAS πρωτεΐνη ικανή να προσδέσει μόνο την C-RAF-1. Η μετάλλαξη Y40C καθιστά

την ενεργή RAS ικανή για πρόσδεση μόνο της PI3K. Η μετάλλαξη E37G περιορίζει την αλληλεπίδραση της RAS μόνο με την RalGDS. Έρευνες πάνω στη μεταλλαγμένη αυτή μορφή έχουν δείξει ότι αλληλεπιδρά και με άλλα μόρια, όπως οι Rin1, AF-6, PLCε και p110. Η αδυναμία των μεταλλαγμένων αυτών μορφών να μετασχηματίζουν ινοβλάστες σε υπόβαθρο συνεχώς ενεργής μορφής της RAS (RAS<sup>V12</sup>) υποδηλώνει ότι οι RAS πρέπει να ενεργοποιήσουν περισσότερα από ένα μονοπάτια για να προκαλέσουν μετασχηματισμένο φαινότυπο [204], [205].

## **1.9. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΟΝΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RAS**

Οι μεταλλαγμένες μορφές των RAS πρωτεϊνών είναι συνεχώς ενεργές με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν ακατάπαυστα τα σηματοδοτικά μονοπάτια και να ελέγχουν με μη φυσιολογικό τρόπο τις κυτταρικές λειτουργίες οδηγώντας τα κύτταρα σε μετασχηματισμό. Οι διάφορες RAS ισομορφές έχουν διαφορετική επιλεκτικότητα για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν με αποτέλεσμα να προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες στα κύτταρα που μετασχηματίζουν. Κάποιες από τις νέες ιδιότητες που αποκτούν τα RAS-μετασχηματισμένα κύτταρα και θα αναλυθούν παρακάτω είναι η αλλαγή στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, αλλαγές στην πρόσφυσή τους και επαγωγή της αγγειογένεσης.

### **1.9.1 ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ**

Η gelsolin είναι μια πρωτεΐνη που επιδρά στη δομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης με την αποκοπή υπομονάδων F-ακτίνης. Έχει προταθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της gelsolin μπορεί να σχετίζονται με την μετάβαση από την καλοήγη στην διεισδυτική κυτταρική αύξηση σε μερικούς αλλά όχι σε όλους τους όγκους [206], [207]. Η κινητικότητα των ινοβλαστών έχει αποδοθεί στη σχέση της δράσης της gelsolin με τη Rac [208] ενώ σε άλλη μελέτη [209] η δράση της gelsolin επηρεάζεται από το μονοπάτι της ογκογόνου RAS και η διεισδυτική ικανότητα των MDCK κυττάρων που



εκφράζουν τη gelsolin εξαρτάται από την ενεργοποίηση της Rac μέσω του μονοπατιού της PI3K και όχι των MAPK.

Πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι η ογκογόνος RAS διαφοροποιεί τα αποτελέσματα των άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, διέγερση με TGFβ οδήγησε σε αναστολή της αύξησης ενώ σε κύτταρα μετασχηματισμένα από το HRAS, σηματοδότηση από εξωγενή TGFβ κατέληξε σε μετάβαση από επιθηλιακό προς μεσεγχυματικό φαινότυπο, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών προς μια ινοβλαστοειδή μορφολογία [210]. Επιπλέον, αυτά τα κύτταρα έγιναν διεισδυτικά και παρουσίασαν αυτοκρινή έκκριση TGFβ καθώς και εξωκυττάρια σηματοδότηση που προκάλεσε την μετάβαση από επιθηλιακό προς μεσεγχυματικό φαινότυπο και σε άλλα κύτταρα.

Πώς οι RAS συνεργάζονται με τον TGFβ είναι άγνωστο, αλλά ο Oft και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι σε μια μεγάλη ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών, η ογκογόνος RAS χρειάζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ για να προκαλέσει μετάσταση [211]. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP κινασών και της PI3K, καθοδικά της συνεχούς ενεργής RAS, μπορούν να ανατρέψουν την αναστολή της ανάπτυξης ή την απόπτωση που προκαλεί ο TGFβ σε φυσιολογικά κύτταρα [212], [213].

### **1.9.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ**

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs) συνιστούν μια οικογένεια με τουλάχιστον 20 μέλη, τα οποία εμπλέκονται στην εξέλιξη των μετασχηματισμένων κυττάρων σε έναν διεισδυτικό φαινότυπο [214]. Αυτές οι πρωτεϊνάσες είναι σημαντικές στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, ώστε να επιτραπεί η μετανάστευση του καρκινικού κυττάρου. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των ενζύμων έχειδειχθεί ότι είναι μετέπειτα από τους «καταρράκτες» σηματοδότησης της συνεχώς ενεργού RAS [215], [216], [217] και διαφέρει για κάθε μεταλλοπρωτεϊνάση σε κάθε κυτταρικό τύπο [214], [218]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 και Ets-1, τελεστές της ογκογόνου RAS μέσω του μονοπατιού των MAPK, μπορούν να επάγουν την έκφραση των MMPs και σε ανθρώπινους εμβρυικούς ινοβλάστες δείχθηκε ότι η μεταγραφή της MMP-1 εξαρτάται από το μονοπάτι της ERK [219]. Διέγερση του

μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μέσω της ογκογόνου HRAS αυξάνει την έκφραση της MMP-9 και μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1, ένας αναστολέας της MMP-9) [220].

### 1.9.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΦΥΣΗ

Ο μετασχηματισμός ενός καρκινικού κυττάρου σε ένα μεταστατικό φαινότυπο απαιτεί αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων [221]. Η σταθερότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων επιτυγχάνεται με μια ποικιλία πρωτεϊνών και δομών, συμπεριλαμβανομένων των στενών συνδέσμων (tight junctions), των διακυτταρικών συνδέσεων (adherens junctions) και των δεσμοσωμάτων [222]. Οι διακυτταρικές συνδέσεις ισχυροποιούνται από τις καντερίνες με τρόπο που εξαρτάται από το ασβέστιο [222] και από τις νεκτίνες με τρόπο που δεν εξαρτάται από το ασβέστιο [223]. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού εξαιτίας της επαφής των κυττάρων μεταξύ τους (contact inhibition), υπερνικάται στα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας τη διείσδυση πέρα από τα όρια του όγκου και τη μετάσταση σε άλλους ιστούς του σώματος. Εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως οι κυτοκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, ξεκινούν την καταστροφή των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες της οικογένειας RAS είναι συχνά οι μεταγωγείς τέτοιων ερεθισμάτων [222].

Ο Friedman και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι το εξωγενές μεταλλαγμένο KRAS, αλλά όχι το HRAS, μπορεί να διαταράξει την ποιότητα των συνδέσεων και την οργάνωση των HD6-4 επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου και αυτό εξαιτίας της ικανότητας του ογκογονιδίου να παρεμποδίζει την ωρίμανση των ιντεγκρινών της κυτταρικής επιφάνειας [224]. Εφόσον οι ιντεγκρίνες πιστεύεται ότι ρυθμίζουν την ενεργοποίηση της RAS μέσω της FAK (focal adhesion kinase) [225], αυτό αντιπροσωπεύει ακόμη έναν βρόχο ανάδρομης ρύθμισης όπου η μεταλλαγμένη RAS οδηγεί στη δική της ενεργοποίηση.

#### **1.9.4 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**

Τα μεταστατικά κύτταρα συχνά μεταναστεύουν σε δευτερεύοντα σημεία μέσω του λεμφαγγειακού δικτύου. Η σηματοδότηση μέσω RAS μπορεί να διευκολύνει τη μετανάστευση μέσω αύξησης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και διέγερσης της αγγειογένεσης [226], [227], [228]. Η ομάδα του Folkman απέδειξε ότι η έκφραση της ογκογόνου RAS σε ενδοθηλιακά κύτταρα άλλαξε τον *in vivo* φαινότυπό τους από κυρίως καλοήγη σε άκρως πολλαπλασιαστικό και διεισδυτικό [229]. Υποστήριξαν ότι αυτή η φαινοτυπική αλλαγή ήταν αποτέλεσμα της αύξησης της μεταγραφής του VEGF και της ενεργότητας των MMPs, διαμεσολαβούμενη από μονοπάτια που εξαρτώνται από την PI3K, ταυτόχρονα με μείωση της δραστηριότητας της TIMP.

Ένας βρόχος θετικής ανάδρομης ρύθμισης μεταξύ των RAS πρωτεϊνών και των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης της οικογένειας HER έχει προταθεί από τον Jorcano και τους συνεργάτες του, δείχνοντας ότι σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με χημικά επαγόμενη καρκινογένεση δέρματος, η ενεργοποίηση της HRAS επάγει μια αυξημένη έκφραση του EGFR, η οποία με τη σειρά της μπορεί να διεγείρει την αγγειογένεση [230].

**ΣΚΟΠΟΣ**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε πολλά στάδια. Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στο εντερικό επιθήλιο κατά την πρόοδο του όγκου προκύπτουν από μια σειρά γενετικών μεταβολών που μεσολαμβάνουν στην εξέλιξη του υπερπλαστικού επιθηλίου σε αδένωμα, αδενοκαρκίνωμα, καρκίνωμα και τελικά σε μεταστατική νόσο. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, το πρώτο γενετικό γεγονός στην ανάπτυξη του ΚΠΕ είναι μια μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο, *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). Περαιτέρω μεταλλάξεις συμβαίνουν στους γενετικούς τόπους των *TP53* και *KRAS*, επιτρέποντας την ανάπτυξη των αδενωμάτων και την εξέλιξη του όγκου [5].

Οι πρωτεΐνες RAS είναι μικρές GTPάσες που εναλλάσσονται μεταξύ μιας ανενεργής μορφής που προσδένει το GDP και μιας ενεργής που προσδένει το GTP [110], [111]. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από τους «παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων» (GEFs) και τις πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη δράση της GTPάσης (GAPs), όπως είναι η Sos και η Ras-GAP αντίστοιχα. Στην ενεργή τους μορφή, οι πρωτεΐνες RAS ρυθμίζουν μόρια-τελεστές και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, ελέγχοντας πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση [161], [162]. Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες RAS είναι η Kirsten-RAS-4A (KRAS4A), η Kirsten-RAS-4B (KRAS4B), η Harvey-RAS (HRAS) και η Neuroblastoma-RAS (NRAS), οι οποίες είναι υψηλά συντηρημένες στην αμινο-τελική περιοχή και διαφέρουν σημαντικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο, απ' όπου και καθορίζεται ο διακριτός ρόλος τους στις κυτταρικές αποκρίσεις. Αυτές οι 4 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια: το *KRAS*, το *HRAS* και το *NRAS*, τα οποία έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα στο 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων. Διαφορετικά RAS γονίδια μεταλλάσσονται σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Προεξέχουσες στον ΚΠΕ είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS*, οι οποίες έχουν ανιχνευθεί στο 32% των ασθενών [7]. Οι πιο κοινές μεταβολές είναι οι σωματικές αντινοσηματικές μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων στις θέσεις 12, 13 και 61, οι οποίες εμποδίζουν τη δράση της GTPάσης της πρωτεΐνης και ακολουθεί αντίσταση στη δράση των GAPs. Συνεπώς, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες RAS βρίσκονται στην ενεργή τους μορφή που προσδένει το GTP [112], προκαλώντας απορύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν και μεταβολές στην κυτταρική αύξηση, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση.

Το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, Caco2, η οποία φέρει

μεταλλάξεις στα *APC* και *TP53* γονίδια και καμία μετάλλαξη στους γενετικούς τόπους των *RAS*. Με μόνιμη επιμόλυνση δημιουργήθηκαν δύο θυγατρικές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες συνεχώς ενεργές μορφές των γονιδίων *KRAS<sup>V12</sup>* και *HRAS<sup>V12</sup>* αντίστοιχα [231], με σκοπό τη δημιουργία ενός πειραματικού μοντέλου σταδιακής εξέλιξης της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου.

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος των ογκογονιδίων *KRAS<sup>V12</sup>* και *HRAS<sup>V12</sup>* στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου:

- χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων για τον εντοπισμό των αλλαγών στο πρωτεομικό προφίλ των Caco2 κυττάρων μετά την έκφραση των ογκογονιδίων *KRAS<sup>V12</sup>* και *HRAS<sup>V12</sup>*,
- ταυτοποιήθηκαν οι αλλαγές ως διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες με φασματομετρία μάζας,
- έγινε ομαδοποίηση των πρωτεϊνών που αλλάζει η έκφρασή τους σύμφωνα με τη βιολογική διεργασία που συμμετέχουν, ώστε να απεικονιστεί η ρύθμιση των διεργασιών αυτών από τα ογκογονίδια,
- επιβεβαιώθηκαν οι βιολογικές διεργασίες που μεταβάλλονται από τα ογκογονίδια με την πραγματοποίηση ειδικών δοκιμών όπως κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου και τέλος,
- μελετήθηκε ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών, με τη χρήση χημικών αναστολέων.

***ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ***

## 2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου Caco2 καθώς και οι δύο θυγατρικές σειρές αυτής μετασηματισμένες από τα ογκογονίδια *KRAS*<sup>V12</sup> (Caco2-KRAS<sup>V12</sup>) και *HRAS*<sup>V12</sup> (Caco2-HRAS<sup>V12</sup>) [231]. Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύχθηκαν ήταν DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS PAN Sera ES από την PAN Biotech GmbH (Lot # P280209)), 1% μη απαραίτητα αμινοξέα (non-essential aminoacids – NEAA) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου, γινόταν ανακαλλιέργεια ή διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 2. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.2 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

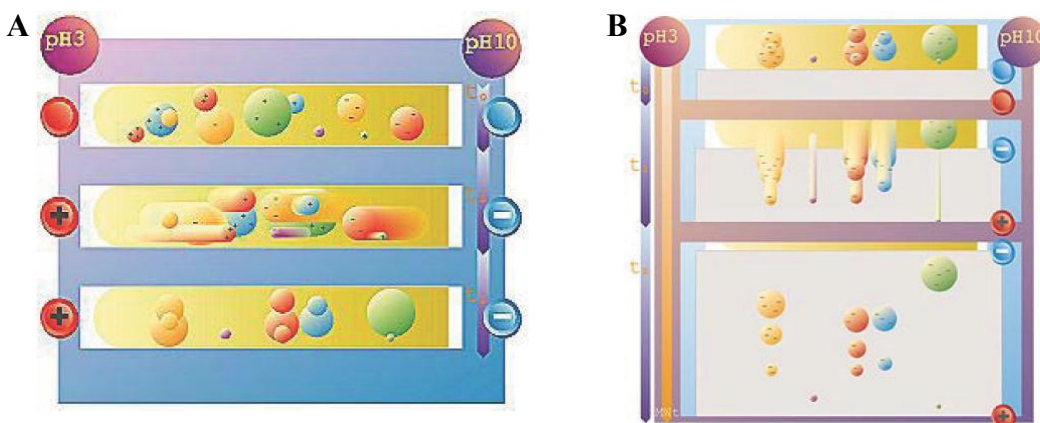
Η λύση των κυττάρων για περαιτέρω ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε δύο διαστάσεις πραγματοποιήθηκε με διαφορετικό τρόπο από εκείνη για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα κύτταρα συλλέχτηκαν σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων – PBS (Phosphate Buffer Saline) και κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε διάλυμα που περιέχει 7M ουρία, 2M θειουρία, 3% CHAPS, 15mg/ml DTT και αναστολείς πρωτεασών [232]. Η λύση των κυττάρων ολοκληρώθηκε σε 10 λεπτά μέσα σε πάγο. Στη συνέχεια, για την απομάκρυνση του DNA προστέθηκαν 10mM σπερμίνης και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Η σπερμίνη είναι μια χημική ένωση θετικά φορτισμένη που προσδένει στο αρνητικά φορτισμένο DNA και το κατακρημνίζει. Η δράση της σπερμίνης ολοκληρώνεται σε μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 200000g για 90 λεπτά, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf και υποβλήθηκε σε υπέρηχους μέτριας έντασης για 10 δευτερόλεπτα εις τριπλούν, για τη διάσπαση υπολειμμάτων DNA. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στα 200000g για 90 λεπτά και τα δείγματα ήταν έτοιμα για προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής



πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο Bradford. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA σε διάλυμα λύσης των κυττάρων. Μετά από επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm.

### 2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων αποτελείται από δύο κύρια στάδια, την ισοηλεκτρική εστίαση, όπου οι πρωτεΐνες του δείγματος διαχωρίζονται ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (εικόνα YM1 A) και την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος (εικόνα YM1 B).



**Εικόνα YM1:** Σχηματική απεικόνιση της πορείας των πρωτεϊνών κατά την ισοηλεκτρική εστίαση – πρώτη διάσταση (A) και κατά την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες – δεύτερη διάσταση (B)

#### 2.3.1 ΙΣΟΗΛΕΚΤΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ – ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ

Η πρώτη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε προκατασκευασμένες ταινίες πολυακρυλαμιδίου 18cm ειδικές για ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης. Οι ταινίες αυτές διαθέτουν διαβάθμιση του pH σε όλο το μήκος τους. Χρησιμοποιήθηκαν ταινίες εύρους pH 3-10 και 3-5.6 μη γραμμικής διαβάθμισης

καθώς και ταινίες εύρους pH 4-7 γραμμικής διαβάθμισης. Οι ταινίες παρέχονται αφυδατωμένες από τον κατασκευαστή και ενυδατώθηκαν με το δείγμα μέσω παθητικής διάχυσης για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην ενυδάτωση χρησιμοποιήθηκαν και αμφολύτες αντίστοιχου εύρους του pH της ταινίας σε συγκέντρωση 0.5%.

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιήθηκε στο σύστημα IEF Cell της εταιρείας BioRad Laboratories (**εικόνα YM2**) και διήρκησε 25 KVh για τις μικρού εύρους pH ταινίες (3-5.6 και 4-7) και 35KVh για τις ταινίες εύρους pH 3-10.

## BIO-RAD PROTEAN IEF cell



**Εικόνα YM2:** Τα μέσα διεκπεραίωσης της ισοηλεκτρικής εστίασης των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. 1. Η κύρια συσκευή ισοηλεκτρικής εστίασης με ενσωματωμένο τροφοδοτικό και δυνατότητα προγραμματισμού 2. Ειδικές θέσεις τοποθέτησης των ενυδατωμένων ταινιών που στα άκρα φέρουν ηλεκτρόδια (σε διάφορα μεγέθη – ανάλογα με το μήκος της ταινίας) 3. Θέσεις μιας χρήσης ενυδάτωσης των ταινιών με το προς ανάλυση δείγμα και 4. ειδικό ορυκτέλαιο για τη διατήρηση του ενυδατωμένου περιβάλλοντος τόσο κατά τη φάση της ενυδάτωσης της ταινίας όσο και κατά τη φάση της ισοηλεκτρικής εστίασης

### **2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ – ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ**

Μετά την ολοκλήρωση της ισοηλεκτρικής εστίασης, οι ταινίες επώαστηκαν σε διάλυμα εξισορρόπησης (6M ουρία, 50mM Tris-HCl pH 6.8, 30% γλυκερόλη και 1% SDS) για 15 λεπτά παρουσία 1% DTT και για 15 λεπτά παρουσία 2.5% ιωδοακεταμιδίου. Στη συνέχεια, προσαρμόστηκαν στην κορυφή συστήματος κάθετης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και σταθεροποιήθηκαν με την πήξη προθερμασμένου διαλύματος 0.8% αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με σταθερά mA, 10mA/gel για 2 ώρες και 15mA/gel για 10 ώρες.

### **2.4 ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ**

Για την εφαρμογή των μεθόδων της πρωτεομικής τεχνολογίας είναι αναγκαία η χρώση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Η χρώση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο επιλέχθηκε ως πιο ευαίσθητη (όριο ανίχνευσης 1-10ng). Αναλυτικά, η χρώση [233] έγινε με τα ακόλουθα βήματα:

1. μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στην πηκτή με διάλυμα που περιέχει 50% μεθανόλη και 5% οξικό οξύ και στη συνέχεια με διάλυμα που περιέχει 50% μεθανόλη με ανάδευση για 20 λεπτά και 10 λεπτά αντίστοιχα
2. πλύση της πηκτής με διπλά απιονισμένο νερό για τουλάχιστον 2 ώρες
3. ευαισθητοποίηση των πρωτεϊνών με διάλυμα 0.02% θειοθειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) για 30 δευτερόλεπτα
4. 3 πλύσεις για 1 λεπτό η καθεμία
5. χρώση με κρύο διάλυμα 0.1% νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ) για 20 λεπτά
6. 3 πλύσεις για 1 λεπτό η καθεμία
7. εμφάνιση χρώσης με διάλυμα 2% ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) και 0.015% φορμαλδεΰδης

8. εξουδετέρωση της αντίδρασης εμφάνισης με διάλυμα 5% οξικού οξέος
9. αποθήκευση της χρωματισμένης πηκτής σε διπλά απιονισμένο νερό στους 4°C

Οι πηκτές συγκρίθηκαν μεταξύ τους οπτικά και στίγματα που υπήρχαν στη μία και όχι στην άλλη ή που είχαν μεγάλη διαφορά στην ένταση αποκόπηκαν προκειμένου να υποβληθούν στην ακόλουθη διαδικασία και να ταυτοποιηθεί η διαφορετικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη. Συμπληρωματικά πραγματοποιήθηκε σάρωση των πηκτών με το GS-800 Densitometer (BioRad) και ανάλυση των εικόνων με το λογισμικό PDQuest (BioRad).

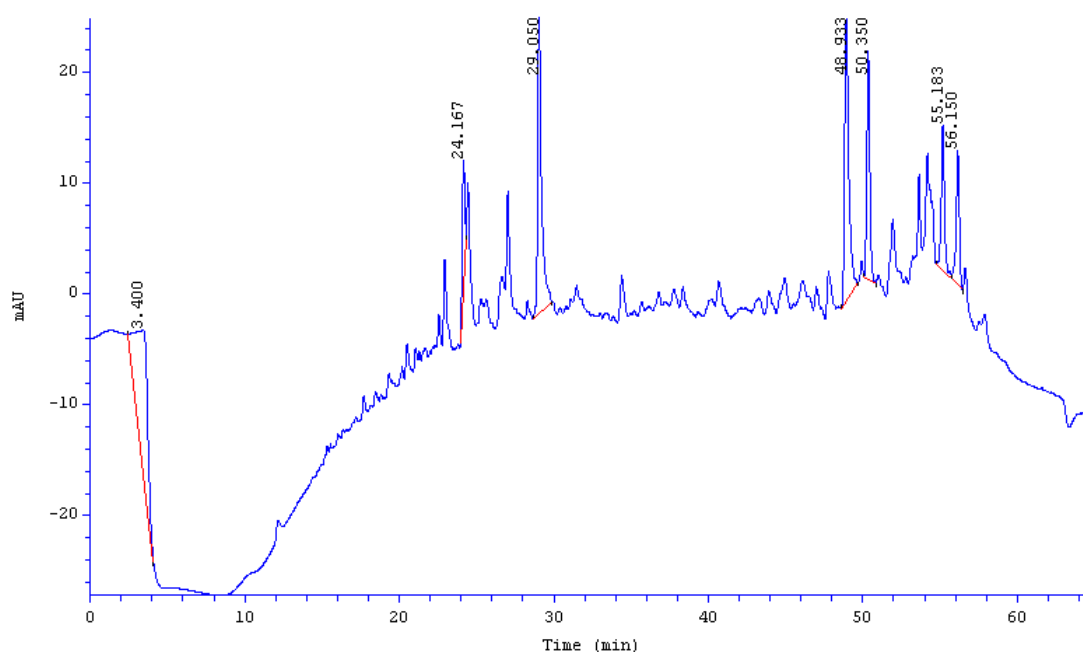
## **2.5 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΠΕΨΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΡΥΨΙΝΗ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ**

Τα στίγματα που αποκόπηκαν από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου υποβλήθηκαν σε αποχρωματισμό (διάλυμα αποχρωματισμού: 30mM σιδηροκυανιούχο κάλιο [ $K_3(FeCN)_6$ ] και 100mM θειοθειικό νάτριο ( $Na_2S_2O_3$ )) και περαιτέρω τεμαχισμό. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις με ακετονιτρίλιο για την απομάκρυνση του SDS, που αναστέλλει την ενεργότητα της τρυψίνης και τελικά αφυδάτωση των δειγμάτων σε συνθήκες κενού. Η ενυδάτωση επέρχεται με το διάλυμα της τρυψίνης (12ng/μl Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega) και η πέψη των άγνωστων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, ακολούθησε έκλυση των πεπτιδίων με διαδοχικά στάδια ενυδάτωσης-αφυδάτωσης. Ο όγκος του τρυψινοποιημένου δείγματος (διάλυμα πεπτιδίων) μειώθηκε με εξάτμιση σε συνθήκες κενού [234].

## **2.6 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ**

Ο όγκος του διαλύματος των πεπτιδίων που προέκυψε από την τρυψινοποίηση του δείγματος προσαρμόζεται στα 10μl με διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0.1% και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης Ultimate (Dionex). Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση τριχοειδούς στήλης χρωματογραφίας

ανάστροφης φάσης PepMap C18 75 $\mu$ m x 15cm (Dionex). Τα πεπτίδια εκλούστηκαν από τη στήλη μέσω διαβάθμισης του διερχόμενου διαλύτη (ακετονιτρίλιο) από 2% σε 80% για 35 λεπτά παρουσία 0.1% μυρμηκικού οξέος με χαμηλή ροή 200nl/min. Πεπτίδια με χαμηλό βαθμό υδροφοβικότητας πολλές φορές δεν δεσμεύονται στην στήλη της χρωματογραφίας και εκλούνται αμέσως, ενώ πολύ υδρόφοβα πεπτίδια συχνά παραμένουν δεσμευμένα στην στήλη μετά την ολοκλήρωση της διαβάθμισης της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη. Τα διαχωρισμένα πεπτίδια ανιχνεύθηκαν μέσω απορρόφησης του πεπτιδικού δεσμού στο υπεριώδες φάσμα (214nm) (εικόνα YM3).

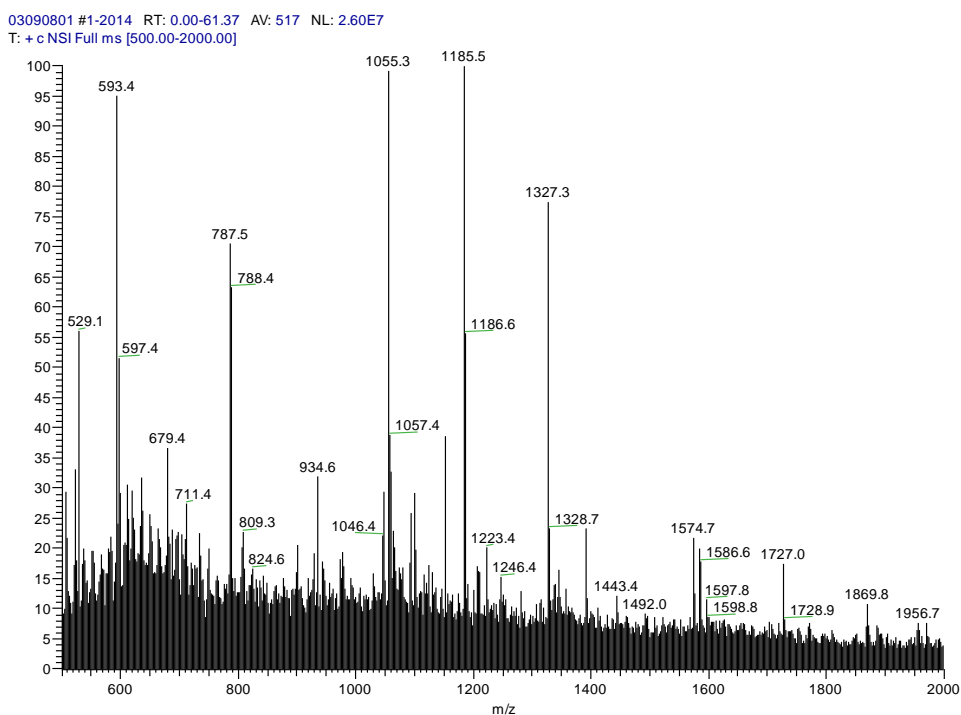


*Εικόνα YM3: Χρωματογράφημα εκλούόμενων πεπτιδίων.*

## 2.7 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ

Τα πεπτίδια μετά την έκλουσή τους από τη στήλη χρωματογραφίας εισήχθησαν στο φασματογράφο μαζών LCQ Deca (Thermo Fisher Scientific) με τη μέθοδο του νανοηλεκτροψεκασμού (nano-ElectroSpray Ionization), όπου ο διαλύτης εξατμίζεται στην αιχμή της βελόνας ψεκασμού και το πεπτίδιο ιονίζεται με την εφαρμογή υψηλού δυναμικού. Στη συνέχεια, τα ιονισμένα πεπτίδια εισήρθαν στο εσωτερικό του μηχανήματος που λειτουργεί υπό κενό για περαιτέρω ανάλυση. Ο φασματογράφος μάζας χρησιμοποιεί μεταβαλλόμενα ηλεκτρικά πεδία προκειμένου να διαχωριστούν

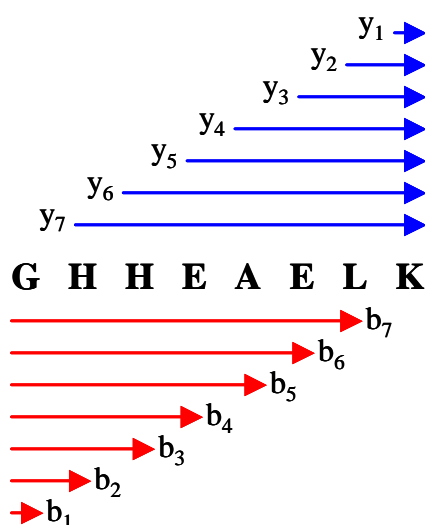
τα ιονισμένα πεπτίδια σύμφωνα με το λόγο μάζα/φορτίο ( $m/z$ ). Το σύνολο των δεδομένων που προκύπτει διαμορφώνει τη γραφική παράσταση της έντασης του σήματος των ιόντων για κάθε τιμή της κλίμακας  $m/z$ , η οποία συνιστά το «φάσμα μαζών» των πεπτιδίων (εικόνα YM4). Ο φασματογράφος μάζας, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, χαρακτηρίζεται, με βάση τον τρόπο προσδιορισμού του λόγου  $m/z$ , ως «παγίδα ιόντων». Στην περίπτωση αυτή, τα ιόντα «παγιδεύονται» μετά την είσοδό τους στο φασματογράφο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, από το οποίο απελευθερώνονται με τις κατάλληλες μεταβολές του δυναμικού μόνο τα ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$  (στην κλίμακα 500-2000), τα οποία τελικά ανιχνεύονται με τη βοήθεια ειδικού οργάνου.



*Εικόνα YM4: Φάσμα μαζών των πεπτιδίων.*

Η συλλογή των δεδομένων γίνεται σε τρία στάδια, που εναλλάσσονται μεταξύ τους. Κατά το **πρώτο** στάδιο, γίνεται προσδιορισμός του λόγου  $m/z$  όλων των ιόντων (πεπτιδίων) που ανιχνεύθηκαν. Κατά το **δεύτερο** στάδιο, υπολογίζεται η μάζα των τριών πιο έντονων ιόντων, τα οποία στο επόμενο στάδιο διασπώνται σε μικρότερα ιόντα, η μάζα των οποίων επίσης υπολογίζεται. Στο **τρίτο** αυτό στάδιο προκύπτουν τα αποκαλούμενα ιόντα b και y. Τα ιόντα αυτά αντιπροσωπεύουν τις πιθανές

ακολουθίες που προκύπτουν από την απομάκρυνση ενός ή περισσότερων αμινοξέων από το συγκεκριμένο πεπτίδιο. Όταν τα αμινοξέα απομακρύνονται από το καρβοξυτελικό άκρο του εκάστοτε πεπτιδίου, τότε η ακολουθία που απομένει ανήκει στην ομάδα των «ιόντων b», ενώ όταν τα αμινοξέα απομακρύνονται από το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου, τότε η ακολουθία που προκύπτει ανήκει στην ομάδα των «ιόντων y». Στην **εικόνα YM5** παρουσιάζεται ως παράδειγμα το πεπτίδιο GHHEAELK και όλα τα δυνατά ιόντα b και y που μπορούν να προκύψουν από το πεπτίδιο αυτό.



### Μοριακές μάζες των ιόντων **b** και **y** (daltons)

Seq	#	b	y	#
G	1	58	-	8
H	2	195	883	7
H	3	332	726	6
E	4	461	589	5
A	5	532	460	4
E	6	661	389	3
L	7	774	260	2
K	8	-	147	1

**Εικόνα YM5:** Σχηματική απεικόνιση των ιόντων b και y που προκύπτουν από τη διάσπαση του πεπτιδίου GHHEAELK. Στον πίνακα καταγράφονται οι μοριακές μάζες των ιόντων αυτών σε daltons.

Παρόλο που σε κάθε στάδιο διάσπασης ενός πεπτιδίου θεωρητικά είναι δυνατόν να προκύψουν όλοι οι συνδυασμοί ιόντων b και y, στην πράξη ανιχνεύονται μόνο κάποια από αυτά. Το ποσοστό του αριθμού των ιόντων b και y που ανιχνεύεται σε κάθε πείραμα ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από την αρχική ποσότητα και καθαρότητα του δείγματος, είναι όμως σαφές ότι όσο πιο πολλά ιόντα ανιχνευθούν και μετρηθεί η μάζα τους, τόσο πιο ασφαλής είναι ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς ακολουθίας του πεπτιδίου και επομένως η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης.

## 2.8 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Τα δεδομένα που συλλέγονται από το φασματογράφο μαζών χρησιμοποιούνται από αλγόριθμους προκειμένου να γίνει αναζήτηση της ακολουθίας σε βάσεις δεδομένων και να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη [235]. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε περιπτώσεις δειγμάτων από οργανισμούς των οποίων το γονιδίωμα έχει αποκωδικοποιηθεί πλήρως, καθώς είναι απαραίτητη προϋπόθεση η γνώση όλων των δυνατών πεπτιδίων για να γίνει η σύγκριση με τα δεδομένα που έχουν συλλεγεί. Με μεγαλύτερη επιφύλαξη μπορεί να γίνει ταυτοποίηση δείγματος από οργανισμό που διαθέτει γονιδίωμα με υψηλό βαθμό ομολογίας με κάποιο άλλο οργανισμό του οποίου το γονιδίωμα έχει πλήρως μελετηθεί [236]. Στην παρούσα εργασία, η συλλογή των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Xcalibur (Thermo Electron Corp.) και η ανάλυση των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση του αλγόριθμου TurboSequest του λογισμικού πακέτου BioworksBrowser 3.3.1 (Thermo Electron Corp.). Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση της άγνωστης πρωτεΐνης στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων του EBI (European Bioinformatics Institute) ipi HUMAN v3.53. Η αναζήτηση της άγνωστης πρωτεΐνης έγινε με μεταβλητές τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της οξειδωσης της μεθειονίνης και της καρβαμιδομεθυλίωσης της κυστεΐνης (από την επώαση με το διάλυμα ιωδοακεταμιδίου). Στις παραμέτρους της αναζήτησης συμπεριλήφθηκε η δυνατότητα να υπάρχουν μέχρι και δύο σημεία που δεν έχει κόψει η τρυψίνη (two missed cleavage sites), απόκλιση από τη θεωρητική ισοτοπική μάζα του πεπτιδίου (peptide mass tolerance)  $\pm 0.5\text{Da}$  και απόκλιση από τη θεωρητική ισοτοπική μάζα των θραυσμάτων των πεπτιδίων (fragment ions tolerance) ( $\text{MS}^2$ )  $1.0\text{amu}$ . Τα πεπτίδια που



ταυτοποιήθηκαν αξιολογήθηκαν βάσει του φορτίου τους σε συνδυασμό με τον αριθμό σχετικής συσχέτισης (XCorr). Τα κριτήρια για αποδοχή της ταυτοποιούμενων πεπτιδίων ήταν  $XCorr > 1.5$  για μονά φορτισμένα πεπτίδια,  $XCorr > 2.5$  για διπλά φορτισμένα πεπτίδια και  $XCorr > 3.5$  για τριπλά φορτισμένα πεπτίδια.

## **2.9 ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ (GENE ONTOLOGY ANALYSIS-BIOLOGICAL PROCESS)**

Η ταυτοποιούμενη πρωτεΐνη συνοδεύεται από έναν κωδικό αριθμό καταχώρισής της σε μια διεθνή βάση που παρέχει πληροφορίες για την αλληλουχία των πρωτεϊνών και τη λειτουργία τους. Οι κωδικοί αυτοί καταχωρούνται στον δικτυακό τόπο <http://biodbnet.abcc.ncifcrf.gov> του National Cancer Institute και μετατρέπονται ταυτόχρονα στις καταχωρήσεις των πρωτεϊνών όσον αφορά τη βιολογική διαδικασία του κυττάρου που συμμετέχουν. Κάθε πρωτεΐνη μπορεί να συμμετέχει σε περισσότερες από μία βιολογικές διαδικασίες ή να μην έχει καμία καταχώριση για συμμετοχή της σε κάποια βιολογική διαδικασία. Επίσης, οι βιολογικές διαδικασίες χωρίζονται σε κατηγορίες και πολλές υποκατηγορίες. Στην παρούσα ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκαν όσο το δυνατόν πιο ευρείες κατηγορίες και πρωτεΐνες που ήταν καταχωρημένες σε περισσότερες από μία κατηγορίες εντάχθηκαν σε όλες.

## **2.10 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN**

Η λύση των κυττάρων έγινε με διάλυμα που περιείχε 50mM Tris-HCl pH 7.4, 1.7% SDS και 10% γλυκερόλη. Στη συνέχεια, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 98°C για 10 λεπτά με ενδιάμεσες αναδεύσεις. Ακολούθησε γρήγορη φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα και ψύξη των δειγμάτων για 5 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό, απομονώθηκε το σύνολο των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανικών και των πυρηνικών, εξαιτίας της χρήσης του SDS, που διαλυτοποιεί το σύνολο των κυτταρικών συστατικών. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της συνολικής

πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο BCA (Pierce). Η πρότυπη καμπύλη έγινε με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Μετά από επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 562nm. Τέλος, στα δείγματα προστέθηκε κατάλληλος όγκος συμπυκνωμένου (6x) αποδιατακτικού διαλύματος Laemmli και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 98°C για 3 λεπτά.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα καθώς και η εταιρεία προέλευσής τους, ο κωδικός τους και η αραίωσή τους στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.

<i>Αντίσωμα</i>	<i>Εταιρεία (κωδικός)</i>		<i>Αραίωση</i>
Αντι-14-3-3 ζ/δ	Santa Cruz (sc-1019)	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:1000
Αντι-CRBP1 (N-17)	Santa Cruz (sc-17145)	Πολυκλωνικό κατσίκας	1:200
Αντι-fascin 1 (55K2)	Gift from Erik Langhoff	Μονοκλωνικό ποντικίου (ασκτικό υγρό)	1:20000
Αντι-gelsolin	Santa Cruz (sc-6405)	Πολυκλωνικό κατσίκας	1:2000
Αντι-HRAS (C-20)	Santa Cruz (sc-521)	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:400
Αντι-KRAS	Santa Cruz (sc-30)	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:100
Αντι-KRAS4B (C-19)	Santa Cruz (sc-520)	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:200
Αντι-lamin A/C	Santa Cruz (sc-56141)	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:1000
Αντι-lamin B1	Santa Cruz (sc-6216)	Πολυκλωνικό κατσίκας	1:1000
Αντι-p44/42	Cell Signaling (#4695)	Μονοκλωνικό κουνελιού	1:2000
Αντι-pan-actin	Cell Signaling (#4968)	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:1000
Αντι-p-p44/42	Cell Signaling (#4370)	Μονοκλωνικό κουνελιού	1:2000
Αντι-RhoGDIα	Santa Cruz (sc-360)	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:1000
Αντι-tubulin	Sigma T9026	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:1000
Αντι-villin 1	BD #610359	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:1500
Αντι-vimentin	Sigma V5255	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:20000
Αντι-β-ακτίνης	Santa Cruz (sc-1615)	Πολυκλωνικό κατσίκας	1:1000
Αντι-επιθηλιακής καντερίνης	BD #610182	Μονοκλωνικό ποντικίου	1:1000

Τα *δευτερογενή αντισώματα* συζευγμένα με υπεροξειδάση (HRP) ήταν: (α) IgG, IgG<sub>2a</sub> και IgM κατά αντιορού ποντικού (Southern Biotech), (β) IgG κατά αντιορού κουνελιού (Millipore) και (γ) IgG κατά αντιορού κατσίκας (Santa Cruz Biotechnology Inc.) και χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:10000.

## **2.11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN**

0.5-10μg συνολικής πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου 6.5-14% σε αποδιατακτικές συνθήκες και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε συνθήκες ημίξηρης φάσης. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα ή 3% BSA σε αλατούχο διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM KCl, 25mM Tris) που περιέχει 0.1% Tween-20 για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η περίσσεια του μέσου δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων και οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα για 16 ώρες στους 4°C. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα TBS-T και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική (horse raddish) υπεροξειδάση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από τρεις πλύσεις των 15 λεπτών με TBS-T, έγινε εμφάνιση του σήματος σε ειδικό φιλμ με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας της εταιρείας Amersham (Amersham, Biosciences, GE Healthcare, Sweden). Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα ήταν αραιωμένα σε διάλυμα 2% BSA σε TBS-T. Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιούνταν μία φορά, ενώ στα πρωτογενή προστέθηκε 0.05% αζίδιο του νατρίου και φυλάσσονταν στους 4°C μέχρι την επόμενη χρήση.

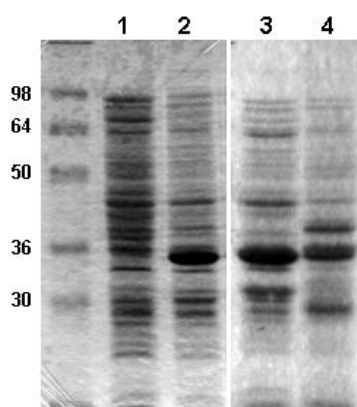
## **2.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ RAS GTPΑΣΩΝ**

Η μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων των ενεργών RAS σε κυτταρικά εκχυλίσματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις RAS αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη μόνο όταν αυτή είναι συνδεδεμένη με GTP. Έτσι, η περιοχή RBD (RAS Binding Domain) της πρωτεΐνης RAF-1 (αμινοξικά κατάλοιπα 51-131) χρησιμοποιείται για κατακρήμνιση συγγένειας της ενεργής RAS-GTP.

### **2.12.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ GST-RBD ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ GST-RBD ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ**

Συμβατά βακτήρια (competent cells) E.coli BL21 μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο PGEX που φέρει την RBD της RAF-1 (δώρο από J.L.Bos) και καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιείχε αμπικιλίνη (75μg/ml). Μία μονή αποικία εμβολιάστηκε σε 5ml υγρό θρεπτικό μέσο (Luria Broth – LB) που περιείχε 75μg/ml αμπικιλίνη για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώθηκε 1:50 σε τελικό όγκο 200ml σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε 75μg/ml αμπικιλίνη και 0.4% D-γλυκόζη και επώαστηκε στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα των βακτηρίων στα 600nm φτάσει 0.6-0.7. Τότε έγινε επαγωγή της έκφρασης του πεπτιδίου με την προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας 100μM IPTG για 3 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, τα βακτήρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3800 rpm για 20 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύθηκαν σε 5ml διαλύματος λύσης (20% σουκρόζη, 10% γλυκερόλη, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM DTT, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών). Τα βακτήρια λύθηκαν με τη χρήση υπερήχων για 10 φορές από 30 δευτερόλεπτα στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 15000rpm για 1 ώρα στους 4°C για την απομάκρυνση των αδιάλυτων κυτταρικών υπολοίπων από το βακτηριακό εκχύλισμα. Η εκτίμηση του εμπλουτισμού του βακτηριακού εκχυλίσματος σε GST-RBD έγινε με ηλεκτροφόρηση δείγματος του εκχυλίσματος, του ιζήματος που προέκυψε μετά την τελευταία φυγοκέντρηση και ολικού βακτηριακού εκχυλίσματος (εικόνα YM6) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% σε συνθήκες αποδιάταξης.

100μl από 10% εναιώρημα σφαιριδίων γλουταθειόνης πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα λύσης κυττάρων (1% NP-40, 10% γλυκερόλη, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 200mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF και αναστολείς πρωτεασών) και επώαστηκαν με 1ml βακτηριακού εκχυλίσματος εμπλουτισμένου σε GST-RBD για 1 ώρα στους 4°C σε περιστροφική ανάδευση. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια που έχουν προσδέσει την GST-RBD πλύθηκαν 4 φορές με διάλυμα λύσης κυττάρων.



**Εικόνα ΥΜ6:** Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με Coomassie ολικού βακτηριακού εκχυλίσματος πριν (γραμμή 1) και μετά (γραμμή 2) την επαγωγή με IPTG, καθαρισμένου βακτηριακού εκχυλίσματος εμπλουτισμένου με GST-RBD (γραμμή 3) και ιζήματος που απομακρύνθηκε κατά τον καθαρισμό (γραμμή 4).

### 2.12.2 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΩΝ RAS-GTP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm. Αφού εκπλυθήκαν 2 φορές με κρύο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) λύθηκαν με 500μl διαλύματος λύσης κυττάρων και παρελήφθησαν με απόξεση. Μετά από επώαση 10 λεπτών στον πάγο, φυγοκεντρήθηκαν στις 15000rpm για 15 λεπτά στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Με τη μέθοδο Bradford, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα. 0.5mg πρωτεΐνης επώαστηκε με 100μl σφαιριδίων GST-RBD για 2 ώρες στους 4°C με περιστροφική ανάδευση. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 4 φορές με διάλυμα λύσης. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρέθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο από το υπερκείμενο διάλυμα, προστέθηκε ίσος όγκος συμπυκνωμένου 2 φορές αποδιατακτικού διαλύματος (2x sample buffer) και ακολούθως τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 98°C για 5 λεπτά. Ίσοι όγκοι φορτώθηκαν εις διπλούν και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και ανοσοαποτύπωση κατά Western με τα αντισώματα α-KRAS4B και α-HRAS.

### 2.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Τα κύτταρα τρυψινοποιήθηκαν και ξεπλύθηκαν με διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν με 70% αιθανόλη για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρηση (1000rpm, 5 λεπτά), το ίζημα αναδιαλύθηκε σε διάλυμα φωσφορικών

αλάτων που περιείχε 0.2% Triton-X100, 10μg/ml Propidium Iodine και 50μg/ml RNase. Επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε η ανάλυση με το BD FACS Canto II και το λογισμικό BD FACS Diva<sup>®</sup> v 5.0.1. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έγινε με το λογισμικό FlowJo.

## 2.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CDNA

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με το αντιδραστήριο TRIZOL της Ambion και το RNA απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA μετρήθηκαν με τη συσκευή NanoDrop και το λογισμικό ND-1000 v3.3.0. Τα δείγματα είχαν  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  και  $A_{260}/A_{230} > 1.8$ . Η παρασκευή του cDNA έγινε με την αντίστροφη μεταγραφή ImProm RT της Promega, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη χρήση oligo(dT)<sub>18</sub> εκκινητών ξεκινώντας από 2μg RNA σε όγκο αντίδρασης 20μl.

## 2.15 ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ

Το cDNA που παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:40 για τα γονίδια-στόχους (HRAS) και σε αραιώση 1:800 για το γονίδιο αναφοράς (18S rRNA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

HRAS sense 5'-ACCCGGCAGGGAGTGGAGGAT-3'

HRAS antisense 5'-CATCAGGAGGGTTCAGCTTCCGC-3'

18S rRNA sense 5'-GGCGCCCCCTCGATGCTCTTAG-3'

18S rRNA antisense 5'-GCTCGGGCCTGCTTTGAACACTCT-3'

Οι παραπάνω εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer3 v.0.4.0 σε περιοχές ένωσης εξωνίων και παραγγέλθηκαν από την Invitrogen Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που εφαρμόστηκε για την ενίσχυση των αντίστοιχων mRNA ήταν:

1. 98°C για 3 λεπτά
2. 98°C για 20 δευτερόλεπτα

3. 60°C για 20 δευτερόλεπτα
4. 72°C για 30 δευτερόλεπτα
5. 72°C για 7 λεπτά

Τα στάδια 2-4 επαναλήφθηκαν για 28 κύκλους στο iCYCLER της εταιρείας BioRad.

## **2.16 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HRAS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNAS)**

Η γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης HRAS έγινε με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNAs). Τα oligονουκλεοτίδια σχεδιάστηκαν με βάση την ανθρώπινη HRAS και δεν έχουν ομοιότητα με καμία αλληλουχία των άλλων RAS πρωτεϊνών [237]. siRNA που αντιστοιχεί σε περιοχή που δεν κωδικοποιεί για κάποιο mRNA χρησιμοποιήθηκε ως oligονουκλεοτίδιο ελέγχου. Τα siRNAs για την ανθρώπινη HRAS παρασκευάστηκαν από την Dharmacon (ThermoScientific) ενώ το siRNA ελέγχου από την GeneCust. Τα oligονουκλεοτίδια εισήχθησαν στα κύτταρα με τη μέθοδο της παροδικής επιμόλυνσης με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου HiPerFect (Qiagen), αφού προηγήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών για την αποτελεσματικότερη γονιδιακή αποσιώπηση. Συγκεκριμένα, οι 3 κυτταρικές σειρές (Caco2, Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2-HRAS<sup>V12</sup>) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων (6-well plates), σε συγκεντρώσεις 1-3x10<sup>5</sup> κύτταρα/θέση και ελέγχθηκε η πυκνότητά τους μετά από 24, 48 και 72 ώρες καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των RAS πρωτεϊνών. Για τη συγκέντρωση των 2x10<sup>5</sup> κυττάρων/θέση, ελέγχθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος επιμόλυνσης, 5nM, 10nM και 25nM. Τέλος, για 2x10<sup>5</sup> κύτταρα/θέση και 10nM διαλύματος επιμόλυνσης δοκιμάστηκαν διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης. Μετά από 72 ώρες, ακολούθησαν πειράματα ανοσοφθορισμού ή συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα για την προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western ή τοποθετήθηκαν τα κύτταρα σε ειδικές θέσεις για *in vitro* έλεγχο κυτταρικής διείσδυσης (invasion assay).

## 2.17 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ (ΑΜΕΣΟΣ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΟΣ)

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν στους απαραίτητους χειρισμούς (παροδική διαμόλυνση με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA). Στη συνέχεια, έγινε πλύση των κυττάρων δύο φορές με διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και μονιμοποίηση με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3% για 10 λεπτά. Ακουλούθησαν τρεις πλύσεις των 2 λεπτών με PBS και επώαση με 0.2% Triton-X100 σε PBS για 5 λεπτά, προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Μετά από τρεις πλύσεις των 2 λεπτών με PBS, έγινε επώαση με 1% BSA/4% goat serum για 30 λεπτά, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, έγινε επώαση με το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος για 16 ώρες στους 4°C. Με το πέρας της επώασης και εφόσον έγιναν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με PBS, έγινε επώαση με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα ποντικού συζευγμένο με Alexa-Fluor-488® ήταν από τη Molecular Probes Inc και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:500. Τα ινίδια της ακτίνης (άμεσος ανοσοφθορισμός) έγιναν εμφανή με φαλλοϊδίνη συζευγμένη με Alexa-Fluor-546® (Molecular Probes Inc) και οι πυρήνες των κυττάρων με χρώση DAPI. Τα αντισώματα ήταν αραιωμένα σε διάλυμα 1% BSA/4% goat serum. Μετά την επώαση με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος, ακολούθησε μονιμοποίηση με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3% σε PBS και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε ειδικό μέσο (mounting medium) πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι καλυπτρίδες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο συνεστιακής απεικόνισης SP5 Leica που διαθέτει πηγή εκπομπής laser ακτινβολίας (Argon-488) και laser στερεάς κατάστασης 561. Απλές εικόνες ή διαδοχικών επιπέδων (z-stack series) ελήφθησαν με 20x ή 40x φακούς Plan Achromat. Η προβολή των z-stack series έγινε με το λογισμικό Leica LAS AF Lite.



## 2.18 ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποιο από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις RAS πρωτεΐνες συμμετέχει στη ρύθμιση των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν χημικοί αναστολείς που σταματούν τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης-μέλους του μονοπατιού και εμποδίζουν, με τον τρόπο αυτό, τη μεταγωγή του σήματος. Παρεμποδίστηκε η λειτουργία του πιο βασικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από τις RAS πρωτεΐνες, το μονοπάτι των MAP κινασών.

Για την παρεμπόδιση της σηματοδότησης του μονοπατιού των MAP κινασών χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς PD98059 (Cell Signaling, #9900) και U0126 (LC Labs, U-6770). Ο PD98059 έχει δείχθει ότι δρα με μεγάλη επιλεκτικότητα ως αναστολέας της ενεργοποίησης της MEK1, προσδένοντας στην ανενεργή MEK1 και εμποδίζοντας την ενεργοποίησή της από ανοδικούς ενεργοποιητές όπως η RAF. Ο U0126 αναστέλλει μη ανταγωνιστικά τις κινάσες διπλής εξειδίκευσης MEK1 και MEK2.

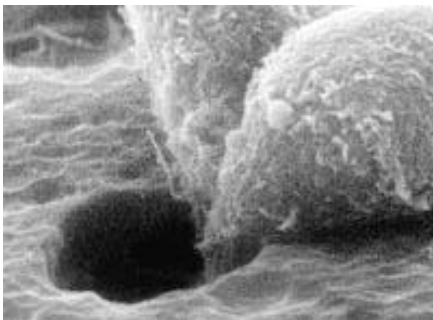
Οι παραπάνω αναστολείς διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO (dimethyl-sulfoxide) και συγκέντρωση 1000x, έτσι ώστε όταν αραιώθηκαν στο θεραπευτικό μέσο καλλιέργειας η συγκέντρωση του DMSO ήταν 0.1% και δεν επηρέασε τη φυσιολογία των κυττάρων (το DMSO σε μεγάλες συγκεντρώσεις επάγει τη διαφοροποίηση).

## 2.19 IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ (INVASION ASSAY)

Μετά τους απαραίτητους χειρισμούς,  $5 \times 10^4$  κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θεραπευτικό μέσο DMEM που περιέχει 1% FBS και τοποθετήθηκαν σε ένθετα πολυκαρβονικής μεμβράνης διαμέτρου 6.5mm, με μέγεθος πόρου 8μm και επιστρωμένης με Matrigel<sup>TM</sup> (BD Biocoat<sup>TM</sup>).

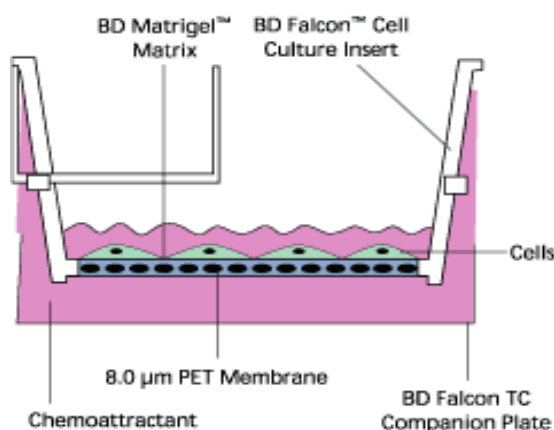
Το Matrigel είναι το εμπορικό όνομα ενός ζελατινώδους μίγματος πρωτεϊνών που εκκρίνεται από τα EHS (Engelbrecht-Holm-Swarm) κύτταρα σαρκώματος ποντικού και παρέχεται από την BD Biosciences. Το μίγμα αυτό είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες

της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η λαμινίνη και το κολλαγόνο, που προσφέρουν στα υπό καλλιέργεια κύτταρα τις πεπτιδικές αλληλουχίες προσκόλλησης που θα έβρισκαν στο φυσικό τους περιβάλλον. Περιέχει, επίσης, αυξητικούς παράγοντες που προάγουν την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών τύπων καθώς και άλλες πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις. Η ακριβής σύστασή του είναι άγνωστη. Αποτέλεσμα της ετερογενούς σύστασής του είναι να διεγείρει μια πολύπλοκη κυτταρική συμπεριφορά. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται σε πολλές *in vitro* δοκιμασίες όπως για τον έλεγχο της αγγειογένεσης, της μετάστασης και της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων (**εικόνα YM7**) και της αυτο-ανανέωσης (self-renewal) των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.



**Εικόνα YM7:** Σάρωση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δύο κυττάρων ανθρώπινου ινοσαρκώματος (HT-1080), τα οποία έχουν διασπάσει τα συστατικά του Matrigel και μεταναστεύουν μέσω του πόρου της πολυκαρβονικής μεμβράνης

Τα ενθέματα τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε αντίστοιχες θέσεις που περιείχαν θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS και αφήθηκαν σε κλίβανο με περιβάλλον 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 22 ώρες (βλέπε διάταξη **εικόνα YM8**).



**Εικόνα YM8:** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του επιστρωμένου με Matrigel ενθέματος τοποθετημένου μέσα σε αντίστοιχη θέση τρυβλίου, κατάλληλου για συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

Η διαφορά στις συγκεντρώσεις του ορού λειτουργεί ως χημειοτακτικό μέσο για τη διέλευση, όσων κυττάρων έχουν την ικανότητα, μέσα από το Matrigel. Τα κύτταρα

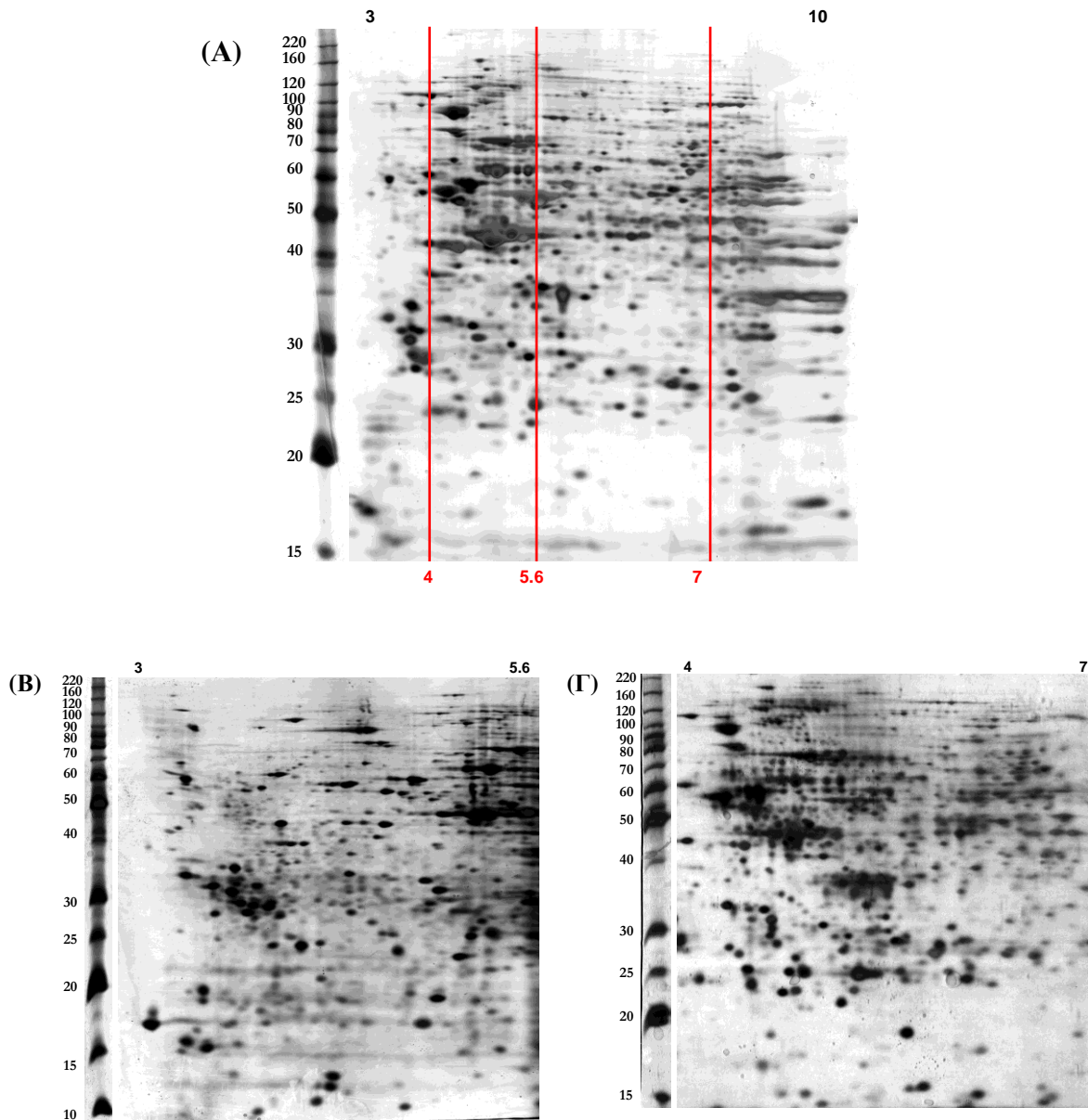
που βρίσκονταν στην εσωτερική πλευρά του ενθέματος και δεν είχαν διεισδύσει το Matrigel απομακρύνθηκαν με βαμβakoφόρο στυλεό. Στη συνέχεια, τα ενθέματα μονιμοποιήθηκαν με 3% παραφορμαλεΐδη και βάφθηκαν με αιματοξυλίνη για 30 λεπτά. Ο αριθμός των κυττάρων που είχε διεισδύσει το Matrigel μετρήθηκε σε 7 τυχαία οπτικά πεδία με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης (Nikon TE300) και μεγέθυνση 10x. Οι πειραματικές επαναλήψεις (technical replicates) συγκρίθηκαν μεταξύ τους με unpaired t-test ώστε να εξακριβωθεί ότι δεν είναι σημαντικά διαφορετικές. Έπειτα συνδυάστηκαν και οι βιολογικές επαναλήψεις (biological replicates) συγκρίθηκαν με paired t-test.

***ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***

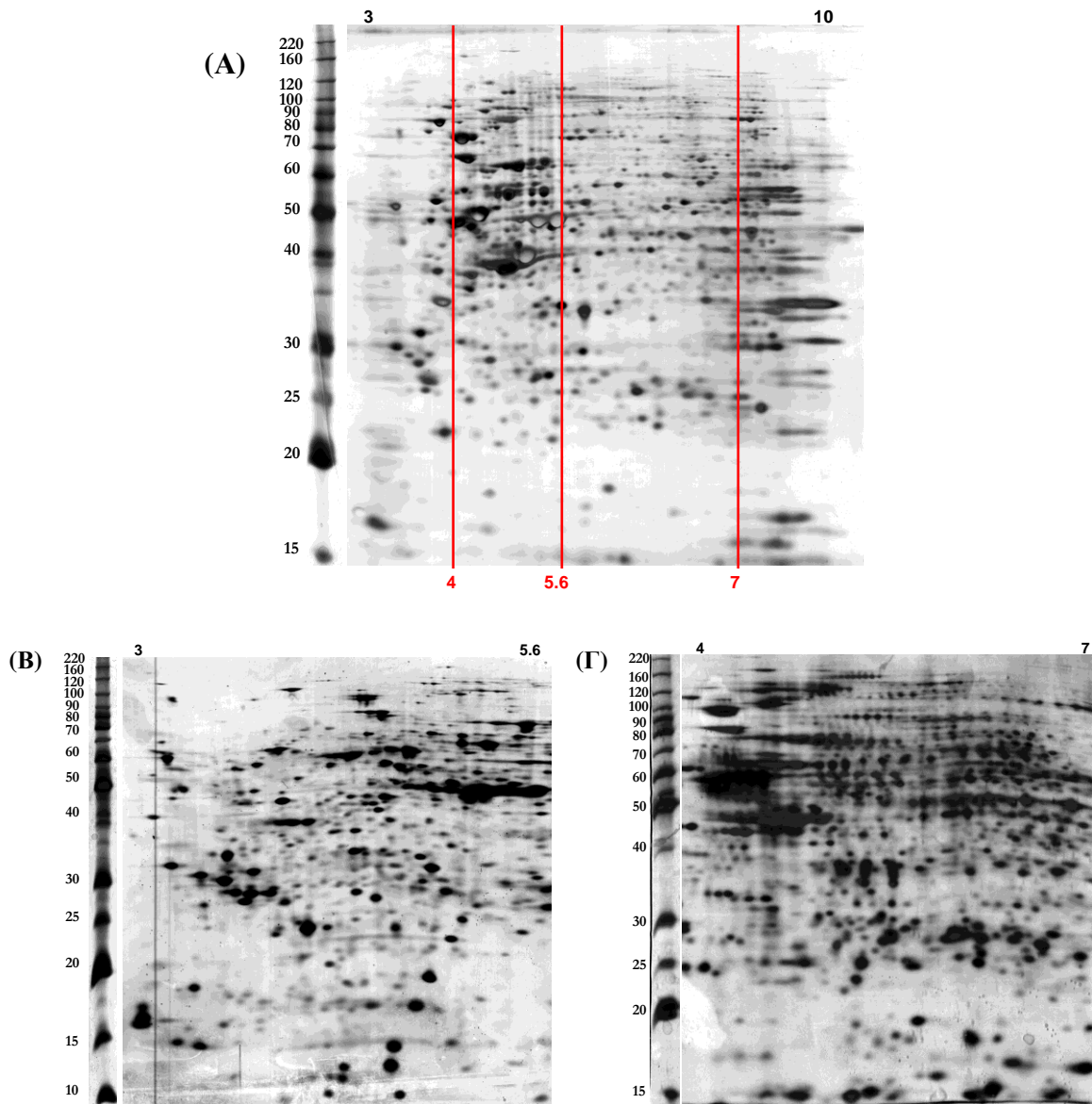
### 3.1 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ Caco2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις τρεις κυτταρικές σειρές: Caco2 (εικόνα A1), Caco2-KRAS<sup>V12</sup> (εικόνα A2) και Caco2-HRAS<sup>V12</sup> (εικόνα A3) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Στην πρώτη διάσταση, χρησιμοποιήθηκαν ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης 18cm μεγάλου εύρους μη γραμμικής διαβάθμισης του pH 3-10, για την απεικόνιση του συνόλου των πρωτεϊνών των κυτταρικών σειρών. Έπειτα, προκειμένου να βελτιωθεί η ανάλυσή τους αλλά και να μειωθεί η πολυπλοκότητά τους χρησιμοποιήθηκαν ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης μικρότερου εύρους pH 3-5.6 μη γραμμικής διαβάθμισης και 4-7 γραμμικής διαβάθμισης. Στις εικόνες A1 (Α), A2 (Α) και A3 (Α) σημειώνονται με κάθετες κόκκινες γραμμές τα σημεία του pH 4, 5.6 και 7 οριοθετώντας τις περιοχές των δειγμάτων που βελτιώθηκε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τη χρήση των ταινιών ισοηλεκτρικής εστίασης μικρότερου εύρους του pH. Έτσι, οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο 3-5.6 σε μια ταινία ισοηλεκτρικής εστίασης εύρους pH 3-10 18cm διαχωρίζονται σε μια περιοχή 6.5cm περίπου. Χρησιμοποιώντας τις ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης μικρότερου εύρους pH 3-5.6 (εικόνες A1 (B), A2 (B) και A3 (B)), η εστίαση αυτών των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε περιοχή 18cm. Το ίδιο ισχύει και με τη χρήση των ταινιών ισοηλεκτρικής εστίασης μικρότερου εύρους του pH 4-7 (εικόνες A1 (Γ), A2 (Γ) και A3 (Γ)).

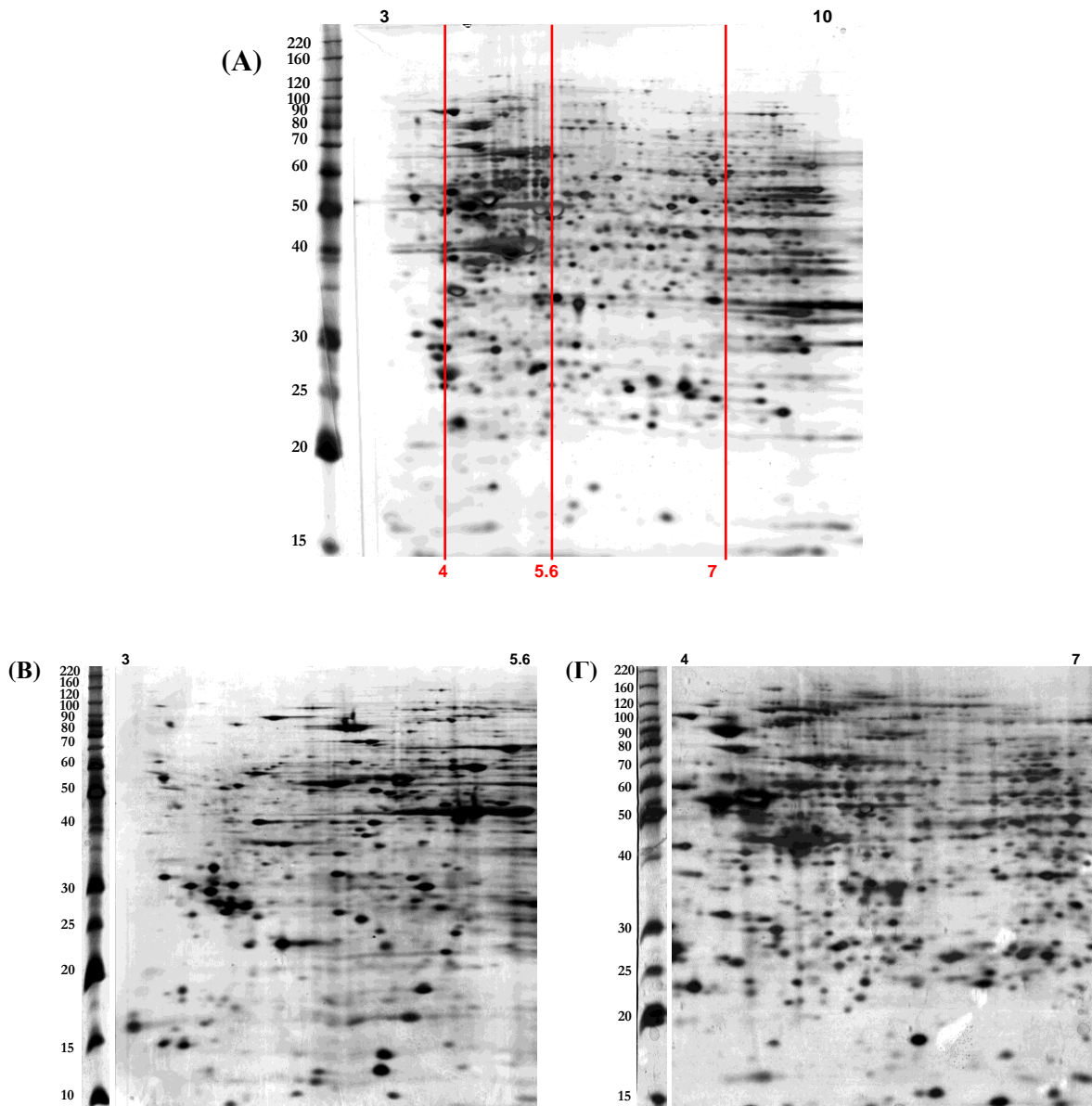
Τα πρωτεομικά προφίλ των RAS-μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών (Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2-HRAS<sup>V12</sup>) συγκρίθηκαν με το προφίλ των Caco2 κυττάρων. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ δειγμάτων που διαχωρίστηκαν σε ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης εύρους pH 3-10, 3-5.6 και 4-7. Τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές σε κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες.



**Εικόνα Α1:** Το πρωτεομικό προφίλ των *Caco2* κυττάρων. Πηκτές πολυακρυλαμιδίου όπου οι πρωτεΐνες έχουν διαχωρισθεί οριζόντια με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο σε ταινίες με διαβάθμιση του pH και κάθετα σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έχει γίνει με χρώση νιτρικού αργύρου. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έχει γίνει σε ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης μη γραμμικής διαβάθμισης του pH (Α) 3-10, (Β) 3-5.6 και (Γ) γραμμικής διαβάθμισης του pH 4-7



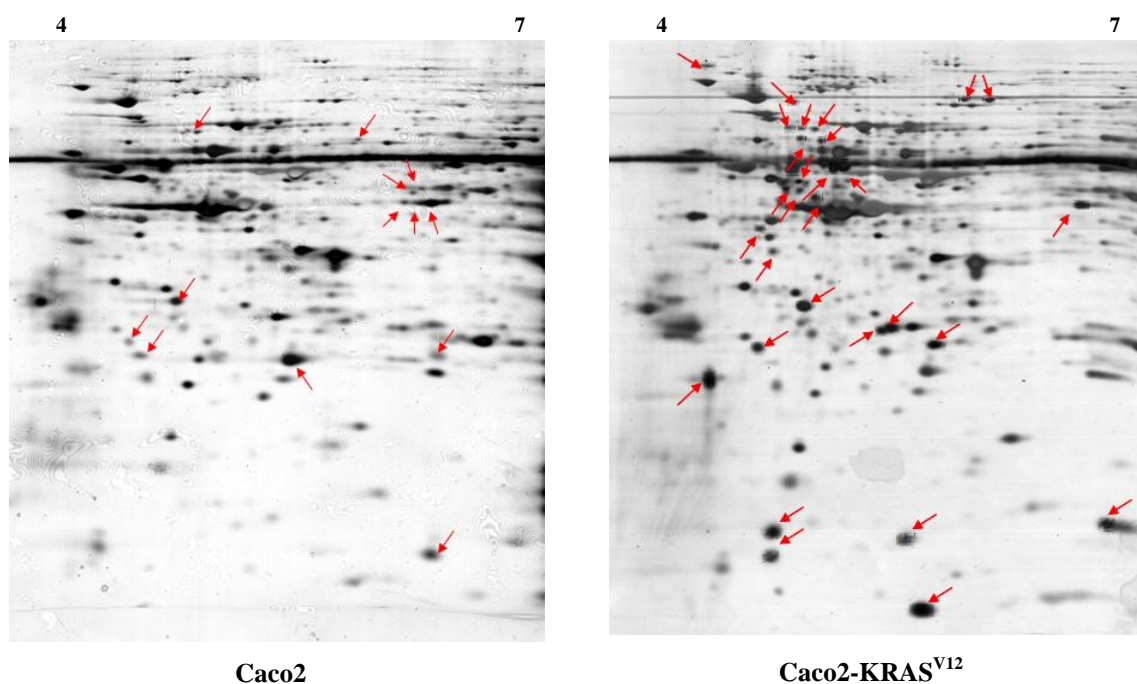
**Εικόνα A2:** Το πρωτεομικό προφίλ των *Caco2-KRAS<sup>V12</sup>* κυττάρων. Πηκτές πολυακρυλαμίδιου όπου οι πρωτεΐνες έχουν διαχωρισθεί οριζόντια με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο σε ταινίες με διαβάθμιση του pH και κάθετα σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έχει γίνει με χρώση νιτρικού αργύρου. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έχει γίνει σε ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης μη γραμμικής διαβάθμισης του pH (A) 3-10, (B) 3-5.6 και (Gamma) γραμμικής διαβάθμισης του pH 4-7



**Εικόνα A3:** Το πρωτεομικό προφίλ των *Caco2-HRAS<sup>V12</sup>* κυττάρων. Πηκτές πολυακρυλαμιδίου όπου οι πρωτεΐνες έχουν διαχωρισθεί οριζόντια με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο σε ταινίες με διαβάθμιση του pH και κάθετα σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έχει γίνει με χρώση νιτρικού αργύρου. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έχει γίνει σε ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης μη γραμμικής διαβάθμισης του pH (A) 3-10, (B) 3-5.6 και (Γ) γραμμικής διαβάθμισης του pH 4-7

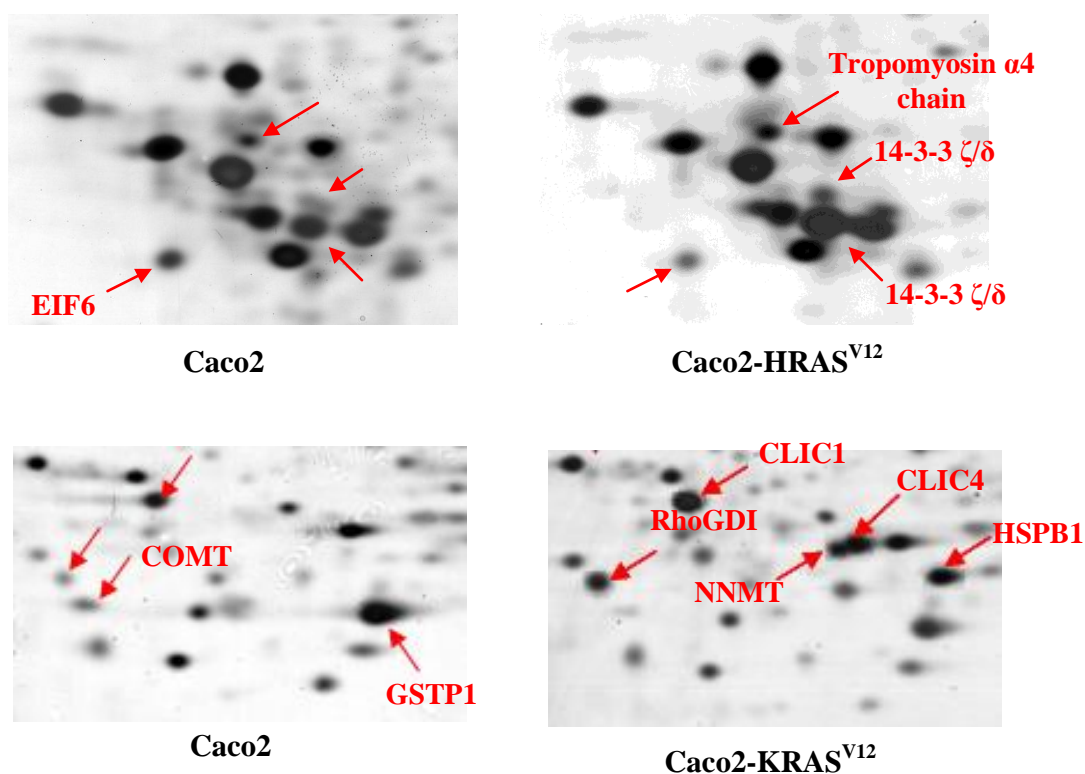


Στην **εικόνα A4** παρουσιάζεται ενδεικτικά η σύγκριση του πρωτεομικού προφίλ των Caco2 και των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> σε εύρος pH 4-7. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται ως διαφορές τα στίγματα που υπάρχουν στην πηκτή του ενός δείγματος και όχι του άλλου ή αυτά που έχουν μεγάλη διαφορά στην ένταση. Ασθενέστερη χρώση δεν σημαίνει απαραίτητα και χαμηλότερη έκφραση, καθώς μπορεί να οφείλεται σε κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση ή σε διαφορετική διαλυτότητα. Στίγματα που υπάρχουν ή είναι πιο έντονα στο πρωτεομικό προφίλ των Caco2 κυττάρων οδηγούν στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση μειώνεται μετά τον μετασχηματισμό από τα RAS ογκογονίδια. Αντίστοιχα, στίγματα που υπάρχουν ή είναι πιο έντονα στα πρωτεομικά προφίλ των RAS-μετασχηματισμένων κυττάρων οδηγούν στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση αυξάνει μετά τον μετασχηματισμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι ταυτόχρονα με τα στίγματα που εντοπίζονται ως διαφορές, αποκόπτονται και άλλα γειτονικά, προκειμένου να οριστεί η περιοχή σύγκρισης.



**Εικόνα A4:** Οπτική σύγκριση δύο πηκτών πολυακρυλαμιδίου όπου οι πρωτεΐνες των Caco2 και Caco2-KRAS<sup>V12</sup> έχουν διαχωριστεί με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο σε ταινίες ισοηλεκτρικής εστίασης γραμμικής διαβάθμισης του pH 4-7. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται τα στίγματα που υπάρχουν στη μία πηκτή και όχι στην άλλη ή έχουν μεγάλη διαφορά στην έντασή τους.

Στην **εικόνα A5** παρουσιάζονται κάποια από τα στίγματα που αποκόπηκαν ως διαφορές μεταξύ των δύο ζευγών δειγμάτων που συγκρίθηκαν (Caco2 vs Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2 vs Caco2-HRAS<sup>V12</sup>) καθώς και οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν. Οι πρωτεΐνες αυτές ταυτοποιήθηκαν μετά από πρωτεολυτική πέψη με τρυψίνη, διαχωρισμό των πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και ταυτοποίησή τους με νανοψεκασμό και διαδοχική φασματομετρία μάζας τύπου παγίδας ιόντων (nano-ESI MS/MS).



**Εικόνα A5:** Ενδεικτικές περιοχές σύγκρισης πηκτών δύο διαστάσεων και ονόματα πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας ως διαφορές

Συνολικά, βρέθηκαν 111 και 123 να εκφράζονται διαφορεικά μετά τον μετασχηματισμό των Caco2 κυττάρων από τα ογκογονίδια KRAS<sup>V12</sup> και HRAS<sup>V12</sup> αντίστοιχα (πίνακας 1). Ο επαγόμενος μετασχηματισμός από το ογκογονίδιο KRAS<sup>V12</sup> επέφερε αύξηση στην έκφραση 49 πρωτεϊνών και μείωση στην έκφραση 62 πρωτεϊνών. Αντίστοιχα, ο μετασχηματισμός από το HRAS<sup>V12</sup> αύξησε την έκφραση 57 πρωτεϊνών και μείωσε την έκφραση 66 πρωτεϊνών.

**Πίνακας 1 :** Προτείνες που ρυθμίζονται διαφορετικά μετά την έκφραση των KRAS<sup>V12</sup> και HRAS<sup>V12</sup>. Με μώβ και ροζ σημειώνονται οι πρωτεΐνες που υπόκεινται σε κοινή ρύθμιση αρνητική και θετική αντίστοιχα και από τα δύο ογκογονίδια.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ Caο2-KRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ						
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας	SWISS PROT	Μοριακό βάρος / Ισοηλεκτρικό σημείο	Πιθανότητα πρωτεΐνης	Κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτίδια	
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	P52815	21335.7 / 9.19	5,60E-10	17,2	1 (0)	
5'-nucleotidase domain-containing protein 1	Q5TFE4	51812.9 / 5.92	1,10E-04	8,1	2 (2)	
Actin-like protein 8	Q9H568	41334.8 / 5.74	6,50E-11	11,5	1 (2)	
Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	19596.4 / 5.68	1,50E-05	33,3	2 (3)	
Adenosylhomocysteinase	P23526	47686.2 / 5.90	1,80E-12	53,7	23 (1)	
Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P49588	106744.2 / 5.22	7,00E-09	13,8	5 (6)	
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P05091	56381.9 / 6.67	3,10E-07	8,7	2 (1)	
Annexin A5	P08758	35915.4 / 4.78	6,00E-09	72,2	16 (3)	
ATP-dependent helicase 2 subunit 1	P12956	69800.1 / 6.21	1,50E-05	18,2	4 (3)	
C14orf166	Q9Y224	28051.7 / 6.20	3,00E-05	12,3	1 (1)	
Calpain small subunit 1	P04632	28298.7 / 4.91	3,90E-10	23,9	6 (1)	
Calreticulin	P27797	48112.8 / 4.14	3,80E-11	54,4	11 (3)	
Catechol O-methyltransferase, membrane bound isoform	P21964-1	30018.6 / 5.15	1,40E-11	48,7	8 (3)	
Charged multivesicular body protein 4b	Q9H444	24935.6 / 4.61	1,30E-10	39,3	6 (1)	
Complement component 1Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Q07021	31343.6 / 4.59	5,90E-04	14,5	1 (1)	
Creatine kinase B-type	P12277	42618.3 / 5.25	6,90E-10	39,1	8 (2)	
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	P20674	16752.7 / 6.36	4,00E-09	14,7	2 (0)	
Elongation factor 1-gamma	P26641	56115.4 / 7.64	1,60E-13	36,3	14 (1)	
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosomal	O14602	16433.3 / 4.92	1,90E-05	11,1	1 (0)	
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1, isoform 2	P63241-2	20158.2 / 6.60	1,80E-06	26,1	3 (0)	
Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	Q9GZV4	16783.2 / 5.28	1,80E-07	24,2	2 (2)	
Eukaryotic translation initiation factor 6	P56537	26583.2 / 4.41	2,80E-14	35,9	4 (2)	
Fatty acid-binding protein, liver	P07148	14208.4 / 6.60	3,60E-05	33,6	2 (2)	
GAPDH	P04406	36031.4 / 8.68	1,60E-15	29,8	4 (4)	
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	P00367	61560.2 / 7.68	2,60E-07	19,0	7 (3)	
Glutathione S-transferase P	P09211	23342.0 / 5.32	4,40E-11	60,5	11 (1)	

Πίνακας 1 (συνέχεια)									
GTP-binding nuclear protein Ran	P62826	24408.6 / 7.30	5.60E-09	43,5	6 (5)				
Keratin 19	P08727	44066.1 / 4.90	2.50E-11	47,5	10 (6)				
L-actylglutathione lyase	Q04760	20765.3 / 4.98	3.20E-10	36,4	5 (2)				
L-lactate dehydrogenase A chain	P00338-1	36666.4 / 8.34	3.30E-11	36,7	10 (2)				
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q15691	29981.2 / 4.87	5.70E-09	63,4	8 (7)				
NADP-dependent malic enzyme	P48163	64110.1 / 5.74	2.10E-11	29,2	13 (1)				
Nuclear transport factor 2	P61970	14470.1 / 4.99	7.80E-11	18,1	1 (1)				
Nucleophosmin	P06748	29447.2 / 4.32	7.90E-09	20,8	3 (1)				
Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	17287.9 / 8.71	9.00E-09	72,4	6 (4)				
Obg-like ATPase 1, isoform 1	Q9NTK5-1	44697.3 / 7.81	3.50E-05	5,4	1 (0)				
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	P04181	48505.2 / 6.61	6.40E-14	46,5	11 (4)				
Peroxioredoxin 2	P32119	21879.2 / 5.59	1.40E-05	17,7	3 (1)				
Peroxioredoxin 6	P30041	25020.2 / 5.97	4.10E-10	46,9	7 (3)				
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	28786.8 / 6.79	1.70E-12	48,8	7 (2)				
Plastin 2	P13796	70245.8 / 5.07	4.40E-15	67,9	22 (13)				
Prohibitin	P35232	29786.9 / 5.46	2.70E-08	43,4	7 (3)				
Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	43760.2 / 6.12	1.20E-12	28,9	3 (5)				
Proteasome subunit beta type 3	P49720	22934.5 / 6.15	9.20E-12	42,4	6 (1)				
Pyruvate kinase isozymes M1/M2, isoform M1	P14618-2	58025.9 / 7.53	1.70E-06	33,5	7 (5)				
Retinal dehydrogenase 1	P00352	54828.0 / 6.30	5.20E-08	11,2	4 (0)				
Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A, beta isoform	P30154	66172.5 / 4.69	1.10E-06	9,0	4 (0)				
Serpin B1 (Leukocyte elastase inhibitor)	P30740	42715.7 / 5.87	7.20E-06	9,0	1 (1)				
Serpin B4	P48594	44826.5 / 5.82	4.20E-04	8,2	3 (0)				
Small nuclear ribonucleoprotein F	P62306	9719.8 / 4.48	3.60E-06	15,1	1 (0)				
S-phase kinase associated protein 1	P63208	18053.0 / 4.16	2.60E-06	8,1	1 (0)				
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1, homolog	Q99536	41894.4 / 5.86	1.80E-14	38,9	9 (2)				
T-complex protein 1 subunit eta	Q99832	59329.9 / 7.50	3.40E-04	4,8	2 (1)				
T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	57988.6 / 6.23	7.40E-10	16,8	2 (5)				
Thioredoxin	P10599	11730.7 / 4.66	1.60E-07	69,5	4 (1)				
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	27676.2 / 7.67	4.20E-11	32,0	4 (1)				
Transcription factor BTF3, isoform 1	P20290-1	22115.4 / 9.90	1.40E-09	19,9	2 (0)				
Transketolase	P29401	68699.1 / 7.46	1.10E-08	10,1	4 (0)				
Triosephosphate isomerase, isoform 1	P60174-1	30772.7 / 5.57	1.30E-11	56,6	14 (1)				
Tropomyosin alpha-1 chain, isoform 1	P09493-1	32689.7 / 4.54	6.50E-07	16,5	3 (2)				

Πίνακας 1 (συνέχεια)					
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	P15374	26167.0 / 4.70	7,20E-09	20,0	1 (2)
Villin 1	P09327	92637.7 / 5.96	1,60E-10	8,3	3 (1)
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ Caco2-KRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ					
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας	SWISS PROT	Μοριακό βάρους / Ισοηλεκτρικό σημείο	Πιθανότητα πρωτεΐνης	Κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτίδια
14-3-3 zeta/delta	P63104	27728.7 / 4.57	1,90E-13	69,0	13 (4)
26S protease regulatory subunit 6A	P17980	49173.5 / 4.99	5,90E-10	12,3	3 (2)
26S protease regulatory subunit 6B, isoform 1	P43686-1	47337.5 / 4.95	7,00E-09	20,8	5 (2)
60S acidic ribosomal protein P1	P05386	11507.7 / 4.04	4,20E-08	19,3	2 (0)
60S acidic ribosomal protein P0	P05388	34252.8 / 5.63	5,40E-11	25,9	2 (2)
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Q9BWD1	41325.4 / 6.49	3,40E-08	23,7	4 (1)
Actin, aortic smooth muscle	P62736	41982.8 / 5.12	2,70E-07	31,8	7 (2)
Annexin A1	P04083	38691.0 / 6.64	2,50E-09	16,8	2 (2)
Annexin A2	P07355	38980.8 / 7.77	1,40E-12	55,5	13 (4)
Cellular retinoic acid-binding protein 2	P29373	15684.0 / 5.23	1,90E-08	47,1	6 (2)
Chloride intracellular channel protein 1	O00299	26906.8 / 4.94	2,80E-11	68,9	11 (3)
Chloride intracellular channel protein 4	Q9Y696	28754.8 / 5.33	2,10E-12	55,3	7 (3)
Chromobox protein homolog 1	P83916	21405.6 / 4.70	2,10E-14	23,8	3 (0)
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	P30084	31368.1 / 8.04	2,30E-05	25,5	5 (2)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	O00303	39122.9 / 5.14	4,70E-11	15,6	3 (1)
Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	15155.6 / 6.79	1,50E-10	59,3	8 (0)
Galectin 1	P09382	14707.2 / 5.18	5,60E-10	70,4	7 (0)
Gelsolin	P06396	85645.2 / 5.86	3,40E-14	29,9	14 (2)
Heat shock protein beta-1	P04792	22769.5 / 5.97	9,20E-09	49,8	5 (1)
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978-1	50945.4 / 5.26	4,90E-10	36,9	10 (3)
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37407.7 / 9.24	1,10E-11	46,7	11 (1)
Hypoxia up-regulated protein 1	Q9Y4L1	111267.2 / 5.02	5,40E-08	2,3	1 (1)
Lamin A/C	P02545	74095.7 / 6.59	0,7	1,8	0 (1)
Lamin B1	P20700	66368.6 / 4.96	2,90E-07	9,9	4 (2)
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	36404.4 / 7.16	4,20E-09	21,3	3 (1)
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P40926	35481.7 / 8.79	2,00E-05	26,0	4 (3)



Πίνακας 1 (συνέχεια)						
Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1, isoform B	O60664-1	47018.9 / 5.18	1,90E-05	14,3		2 (2)
Nicotinamide N-methyltransferase	P40261	29556.1 / 5.46	6,40E-09	26,1		3 (2)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18001.9 / 7.82	1,60E-09	40,6		7 (0)
Proteasome activator complex subunit 2	Q9UL46	28585.0 / 6.03	2,70E-06	4,8		1 (0)
Proteasome subunit alpha type 2	P25787	25883.3 / 7.29	3,10E-10	41,9		5 (1)
Protein DJ-1	Q99497	19879.5 / 6.38	3,40E-08	36,0		2 (1)
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2, isoform 1	P21980-1	77280.7 / 4.97	2,40E-13	24,7		10 (2)
Pyruvate kinase isozymes M1/M2, isoform M2	P14618-1	57937.0 / 7.96	6,50E-04	12,4		2 (5)
Ran-specific GTPase activating protein	P43487	23277.6 / 5.07	6,70E-11	21,4		3 (0)
Retinol binding protein 1, cellular isoform a	P09455	22297.1 / 5.72	1,20E-14	53,3		12 (2)
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	23193.7 / 4.86	2,70E-10	34,8		5 (2)
S100A4	P26447	11721.7 / 5.80	5,30E-07	36,6		3 (1)
SET, isoform 2	Q01105-2	32084.7 / 3.96	1,60E-08	24,9		6 (0)
similar to 40S ribosomal protein S12	TREMBL:Q76M58	14506.5 / 6.97	2,00E-09	33,3		2 (2)
Stromatin-like protein 2	Q9UJZ1	38511.2 / 7.25	6,30E-08	9,3		1 (1)
Suppressor G2 allele of SKP1 homolog, isoform 2	Q9Y2Z0-2	37781.9 / 4.97	1,00E-09	25,8		5 (2)
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog, isoform 1	Q9Y2Z0-1	40999.5 / 4.93	9,70E-11	35,4		9 (1)
Transcription elongation factor B polypeptide 2	Q15370	13125.6 / 4.58	5,00E-07	16,1		2 (0)
Transgelin 2	P37802	22378.2 / 8.41	8,40E-05	35,2		4 (2)
Tropomyosin alpha - 4 chain, isoform 1	P67936-1	28505.5 / 4.52	4,90E-10	25,0		5 (1)
Tubulin beta-2C chain	P68371	49800.0 / 4.65	2,70E-10	15,7		2 (3)
Vimentin	P08670	53620.1 / 4.91	5,90E-09	34,1		12 (2)
Voltage-dependent anion selective channel protein 2	P45880-2	38069.7 / 6.34	2,90E-10	27,7		3 (2)

Πίνακας 1 (συνέχεια)						
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ Caco2-HRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ						
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας	SWISS PROT	Μοριακό βάρος / Ισοηλεκτρικό σημείο	Πιθανότητα πρωτεΐνης	Κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτιδα	
14-3-3 protein epsilon	P62258	29156.4 / 4.48	5,40E-08	54,5	11 (6)	
6-phosphogluconolactonase	O95336	27530.6 / 5.66	4,60E-08	20,2	2 (1)	
Acetyl-CoA acetyltransferase cytosolic	Q9BWD1	41325.4 / 6.49	4,50E-05	7,0	1 (1)	
Actin-like protein 8	Q9H568	41334.8 / 5.74	5,50E-10	32,8	6 (1)	
Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	19596.4 / 5.68	2,10E-09	55,6	8 (0)	
Adenosylhomocysteinase	P23526	47686.2 / 5.90	1,50E-09	31,7	9 (3)	
AGR2	O95994	22224.7 / 9.15	2,00E-05	17,9	3 (0)	
Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	P49419	58451.1 / 7.91	2,10E-11	26,5	10 (1)	
Aldo-keto reductase family 1 member C2	P52895	36713.0 / 7.23	4,60E-04	18,6	3 (1)	
Aldolase 1-epimerase	Q96C23	37743.1 / 6.19	1,40E-05	12,0	1 (1)	
Aminoacylase-1	Q03154	55959.8 / 6.58	2,20E-06	16,7	3 (3)	
Annexin A3	P12429	36353.7 / 5.55	1,20E-10	62,2	14 (4)	
ATP synthase subunit d, mitochondrial, isoform 1	O75947-1	18480.5 / 5.07	1,60E-09	13,0	2 (0)	
Catechol O-methyltransferase, membrane bound isoform	P21964-1	30018.6 / 5.15	1,90E-07	14,0	3 (0)	
Cellular retinoic acid-binding protein 1	P29762	15556.8 / 5.13	1,30E-06	30,7	4 (0)	
Coactosin-like protein	Q14019	15936.3 / 5.38	2,80E-05	43,0	5 (2)	
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	P13804	35058.6 / 8.45	1,20E-12	52,0	10 (2)	
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	P30084	31368.1 / 8.04	1,30E-10	33,8	8 (0)	
ERp29	P30040	28976.2 / 7.28	2,60E-06	20,3	3 (1)	
ES1 protein homolog, mitochondrial, long isoform	P30042-1	28153.7 / 8.26	6,70E-09	37,3	6 (0)	
F-actin-capping protein subunit alpha-1	P52907	32903.3 / 5.36	6,40E-11	18,5	4 (0)	
Fatty acid-binding protein, liver	P07148	14208.4 / 6.60	3,10E-10	51,5	4 (2)	
Glutathione S-transferase omega-1	P78417	27549.0 / 6.24	8,70E-05	37,8	1 (6)	
Glutathione S-transferase P	P09211	23342.0 / 5.32	8,30E-13	60,5	12 (0)	
Guanidinoacetate N-methyltransferase	Q14353	26302.1 / 5.72	9,60E-13	18,2	1 (1)	
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	P62873	37354.0 / 5.55	2,00E-06	7,4	2 (0)	
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	P62879	37308.1 / 5.55	3,90E-06	15,0	2 (2)	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	P52597	45643.9 / 5.27	8,40E-14	32,5	9 (2)	
Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2, isoform 1	Q9YNI6-1	45366.5 / 8.04	1,40E-08	20,1	6 (0)	

Πίνακας 1 (συνέχεια)						
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	32640.2 / 5.47	9,50E-13	59,2	10 (3)	
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	46630.5 / 6.57	3,20E-09	35,7	10 (2)	
Lactoylglyutathione lyase	Q04760	20765.3 / 4.98	1,50E-07	40,2	7 (1)	
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	36404.0 / 7.16	2,20E-08	10,5	2 (0)	
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q15691	29981.2 / 4.87	5,60E-08	51,5	7 (5)	
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog, isoform 1	O96008-1	37870.1 / 6.87	2,70E-09	10,5	2 (1)	
NADP-dependent malic enzyme	P48163	64110.1 / 5.74	2,10E-05	29,9	6 (8)	
Nucleoside diphosphate kinase A	P15531	17138.7 / 5.78	2,90E-10	73,0	9 (1)	
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	P04181	48505.2 / 6.61	7,90E-11	39,6	10 (1)	
PCTP-like protein	Q9Y365	33028.6 / 6.73	1,40E-05	25,1	3 (2)	
Peroxioredoxin 2	P32119	21879.2 / 5.59	6,50E-13	56,6	8 (2)	
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	28786.8 / 6.79	3,20E-10	40,1	6 (0)	
Plastin 2	P13796	70245.8 / 5.07	1,70E-10	65,1	27 (7)	
Plastin-3	P13797	70767.2 / 5.30	1,60E-11	12,9	2 (5)	
Poly(rC)-binding protein 1	Q15365	37475.0 / 6.71	2,60E-05	41,0	7 (5)	
Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	28706.0 / 5.70	2,30E-07	48,2	5 (6)	
Proteasome activator complex subunit 2	Q9UL46	28585.0 / 6.03	4,80E-10	46,6	6 (4)	
Proteasome subunit beta type-6	P28072	25342.5 / 4.65	3,20E-08	22,2	2 (2)	
Protein disulfide-isomerase	P07237	57081.7 / 4.61	3,10E-04	9,3	2 (2)	
Pyruvate-5-carboxylate reductase 2	Q96C36	33616.7 / 7.66	4,00E-08	18,1	4 (1)	
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	P11177-1	39209.0 / 6.21	1,00E-08	23,7	6 (2)	
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	Q9NQG5	36878.2 / 5.64	5,10E-11	13,2	1 (2)	
Serine/threonine-protein phosphatase PPI-gamma catalytic subunit, isoform gamma-1	P36873-1	36960.7 / 6.11	4,40E-12	30,0	4 (2)	
Serpin B1 (Leukocyte elastase inhibitor)	P30740	42715.7 / 5.87	2,00E-10	22,9	4 (3)	
S-phase kinase associated protein 1	P63208	18053.0 / 4.16	3,50E-05	28,8	3 (1)	
Sumo-1 activating enzyme subunit 1	Q9UBE0	38426.6 / 5.04	1,00	13,0	2 (1)	
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P04179	24707.6 / 8.38	1,40E-05	26,6	5 (1)	
T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	60306.6 / 5.74	1,60E-11	48,7	13 (6)	
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	27676.2 / 7.67	7,40E-11	52,3	5 (3)	
Transaldolase	P37837	35224.4 / 6.38	4,50E-05	25,2	8 (1)	
TRIM12-like protein	Q9UI30	14191.3 / 5.09	2,70E-10	20,8	1 (1)	
Tu translation elongation factor, mitochondrial precursor	P49411	49844.3 / 7.36	6,10E-08	41,1	7 (7)	
Tumor protein D54, isoform 2	O43399-2	19890.1 / 5.22	5,10E-04	11,3	1 (0)	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K, isoform 1	P61086-1	22393.6 / 5.20	2,80E-04	13,0	1 (1)	



Πίνακας 1 (συνέχεια)					
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	P61088	17128.0 / 6.16	1,90E-06	41,4	2 (1)
Vacuolar protein sorting 29	Q9UBQ0	20493.7 / 6.32	4,40E-06	15,9	2 (1)
Villin 1	P09327	92637.7 / 5.96	1,50E-14	23,7	10 (6)

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ Caco2-HRAS <sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ						
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας	SWISS PROT	Μοριακό βάρος / Ισοηλεκτρικό σημείο	Πιθανότητα πρωτεΐνης	Κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτιδά	
I4-3-3 zeta/delta	P63104	27728.7 / 4.57	2,40E-11	64,5	13 (4)	
I4-3-3 beta/alpha	P31946-1	28065.8 / 4.61	4,30E-09	38,6	5 (1)	
I4-3-3 eta	Q04917	27747.8 / 4.53	9,80E-07	22,0	5 (0)	
I4-3-3 theta	P27348	28202.0 / 4.61	2,00E-05	37,0	4 (2)	
60S acidic ribosomal protein P1	P05386	11507.7 / 4.04	1,00E-07	19,3	2 (0)	
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	P39687	28569.3 / 3.83	2,10E-05	14,9	2 (0)	
Actin, aortic smooth muscle	P62736	41982.8 / 5.12	3,20E-06	22,8	2 (3)	
Alcohol dehydrogenase class-3	P11766	39699.4 / 7.29	1,80E-07	29,1	3 (5)	
Annexin A1	P04083	38691.0 / 6.64	1,20E-12	64,7	18 (4)	
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	P12956	69800.1 / 6.21	1,30E-13	38,6	14 (6)	
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	P13010	82653.3 / 5.46	2,50E-07	15,7	4 (4)	
Bifunctional purine biosynthesis protein	P31939	64576.3 / 6.27	7,20E-10	28,7	5 (8)	
C19orf10	Q969H8	18784.3 / 6.23	5,10E-08	8,7	1 (0)	
Calcyclin-binding protein	Q9HB71-1	26194.7 / 8.56	2,20E-15	58,8	8 (3)	
Calmodulin	P62158	16827.8 / 3.93	1,10E-12	51,7	3 (5)	
Cellular retinoic acid-binding protein 2	P29373	15693.9 / 5.23	1,40E-05	37,0	2 (1)	
Chloride intracellular channel protein 1	O00299	26906.8 / 4.94	3,30E-09	70,5	10 (2)	
Chloride intracellular channel protein 4	Q9Y696	28754.8 / 5.33	2,50E-11	69,6	14 (1)	
Cofilin 1	P23528	18491.7 / 8.19	2,90E-08	15,1	2 (1)	
Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic isoform a	P30085	25839.4 / 7.96	2,00E-09	28,9	2 (3)	
Fascin-1	Q16658	54497.1 / 6.87	4,00E-10	29,4	9 (0)	
Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	15155.6 / 6.79	1,00E-08	59,3	8 (0)	
Galectin 1	P09382	14707.2 / 5.18	3,30E-10	63,0	4 (2)	
Gelsolin	P06396	85645.2 / 5.86	6,70E-16	31,6	12 (3)	
GTP-binding nuclear protein, Ran	P62826	24408.6 / 7.30	1,60E-10	19,9	3 (0)	

Πίνακας 1 (συνέχεια)							
Heat shock protein 90-alpha	P07900-2	98100.5 / 4.93	6,90E-09	36,3	18 (8)		
Heat shock protein 90-beta	P08238	83213.1 / 4.82	8,30E-12	49,3	24 (8)		
Heat shock protein beta-1	P04792	22769.5 / 5.97	3,60E-11	72,2	9 (4)		
High mobility group protein B1	P09429	24879.2 / 5.49	2,40E-07	20,9	2 (3)		
Histone-binding protein RBBP4	Q09028	47627.1 / 4.60	4,40E-05	12,7	3 (2)		
Hypoxia up-regulated protein 1	Q9Y4L1	111267.2 / 5.02	3,20E-06	4,8	2 (1)		
Importin 5	O00410	125464.8 / 4.66	2,50E-09	1,5	1 (0)		
Importin subunit alpha-2	P52292	57827.2 / 5.13	1,00E-08	35,3	8 (4)		
Importin subunit alpha-3	O00505	57775.9 / 4.66	6,70E-04	2,7	1 (0)		
Importin subunit beta-1	Q14974	97109.0 / 4.53	1,10E-09	17,2	8 (3)		
Lamin A/C	P02545	74095.7 / 6.59	1,50E-07	2,4	1 (0)		
Lamin B1	P20700	66368.6 / 4.96	2,10E-13	39,2	19 (1)		
Nicotinamide N-methyltransferase	P40261	29556.1 / 5.46	1,50E-07	11,7	1 (1)		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18001.9 / 7.82	4,30E-04	14,5	2 (0)		
Proliferative cell nuclear antigen	P12004	28751.3 / 4.42	4,60E-10	35,2	6 (4)		
Proteasome subunit beta type 3	P49720	22934.5 / 6.15	2,30E-08	46,8	3 (3)		
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2, isoform 1	P21980-1	77280.7 / 4.97	3,20E-10	30,7	8 (8)		
Retinol binding protein 1, cellular isoform a	P09455	22297.1 / 5.72	1,20E-12	45,2	12 (2)		
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	23193.7 / 4.86	3,60E-09	31,9	5 (0)		
S100A11	P31949	11733.8 / 7.01	9,10E-11	63,8	2 (2)		
S100A4	P26447	11721.7 / 5.80	1,70E-05	36,6	4 (1)		
S-formylglutathione hydrolase	P10768	31443.5 / 6.58	1,00E-11	50,0	5 (2)		
Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	73635.8 / 5.80	3,90E-06	13,8	4 (3)		
Stress-induced phosphoprotein 1	P31948	62600.4 / 6.39	4,70E-08	19,3	8 (1)		
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P00441	15926.9 / 5.68	1,10E-10	24,7	1 (1)		
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog, isoform 2	Q9Y2Z0-2	37781.9 / 4.97	2,10E-09	28,8	5 (2)		
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog, isoform 1	Q9Y2Z0-1	40980.5 / 4.93	8,90E-08	24,9	4 (3)		
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	89266.7 / 5.00	6,80E-06	23,3	4 (9)		
Tropomyosin alpha - 4 chain, isoform 1	P67936-1	28505.5 / 4.52	3,80E-10	38,7	6 (3)		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	24809.5 / 5.22	1,00E-08	30,0	3 (1)		
Vimentin	P08670	53620.1 / 4.91	2,60E-09	27,5	9 (2)		
WD-repeat-containing protein 1, isoform 1	O75083-1	66152.9 / 6.18	2,60E-11	46,2	14 (6)		

### 3.2 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ *RAS* ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΠΟΙΚΙΛΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ (GO ANALYSIS)

Από τη σύγκριση των πρωτεομικών προφίλ των Caco2 κυττάρων με τα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και τα Caco2-HRAS<sup>V12</sup>, προέκυψαν τέσσερις λίστες πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από τα δύο ογκογονίδια *RAS*. Οι λίστες αυτές δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βιολογικές διεργασίες των κυττάρων που επηρεάζονται μετά τον μετασχηματισμό τους από τα ογκογονίδια *RAS*. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι κυτταρικές λειτουργίες που πιθανώς αλλάζουν, οι πρωτεΐνες ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την καταχώρισή τους σε διεθνή βάση δεδομένων ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org) και [www.ebi.ac.uk/GOA](http://www.ebi.ac.uk/GOA)) για τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν δεν έχουν καταχώριση ενώ άλλες αντιστοιχούν σε περισσότερες από μία κατηγορίες. Οι κατηγορίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ομαδοποίηση των πρωτεϊνών είναι οι εξής:

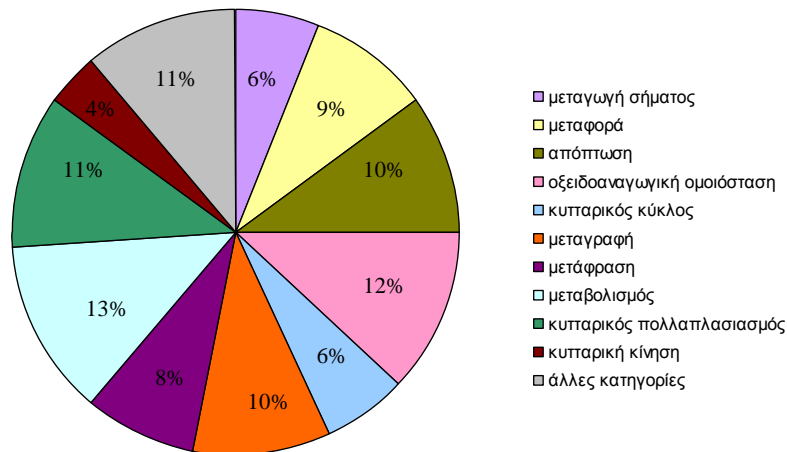
- **μεταγωγή σήματος** (GO:0007165),
- **μεταφορά** (GO:0006810), με υποκατηγορίες όπως η έξοδος πρωτεϊνών από τον πυρήνα (GO:0006611) και η έξοδος μορίων RNA από τον πυρήνα (GO:0006405),
- **απόπτωση** (GO:0006915) και ρύθμισή της (GO:0042981)
- **οξειδοαναγωγική ομοιόσταση** (GO:0045454) και κυτταρική απόκριση στις ενεργές ρίζες οξυγόνου (GO:0034614)
- **κυτταρικός κύκλος** (GO:0007049), με υποκατηγορία τη μίτωση (GO:0007067)
- **μεταγραφή** (GO:0006350) και ρύθμισή της (GO:0006355)
- **μετάφραση** (GO:0006412) και έναρξή της (GO:0006413)
- **μεταβολισμός** (GO:0008152), με υποκατηγορίες όπως η γλυκόλυση (GO:0006096) και η ρύθμισή της (GO:0006110)
- **κυτταρικός πολλαπλασιασμός** (GO:0008283) και ρύθμισή του (GO:0008284)
- **κυτταρική κίνηση** (GO:0006928)

Πιο αναλυτικά, η σύγκριση των Caco2 με τα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα οδήγησε στην ταυτοποίηση 62 πρωτεϊνών που ρυθμίζονται αρνητικά από το ογκογονίδιο *KRAS<sup>V12</sup>*. Από αυτές οι 6 δεν είναι καταχωρημένες να συμμετέχουν σε κάποια βιολογική διεργασία του κυττάρου. Από τις υπόλοιπες 56 πρωτεΐνες, το 23% αφορά την

κατηγορία του μεταβολισμού, το 21% την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου, το 20% τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το 18% την απόπτωση, ενώ 20% αυτών των πρωτεϊνών δεν ανήκουν σε κάποια από τις προαναφερθείσες κατηγορίες (εικόνα Α6 (Α)).

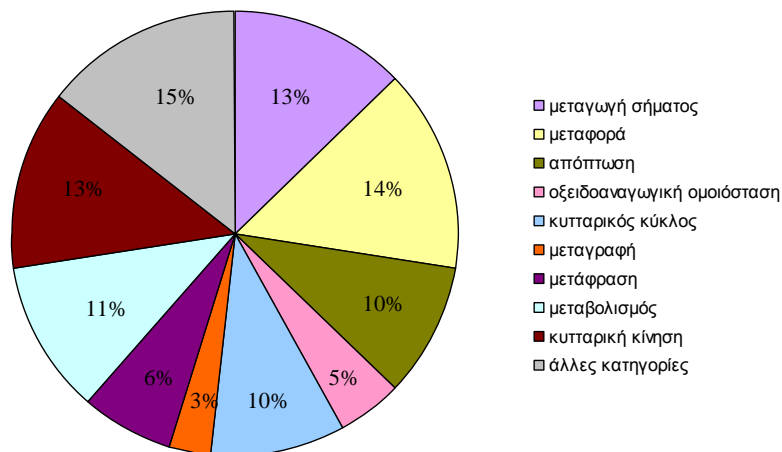
**A**

Πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα



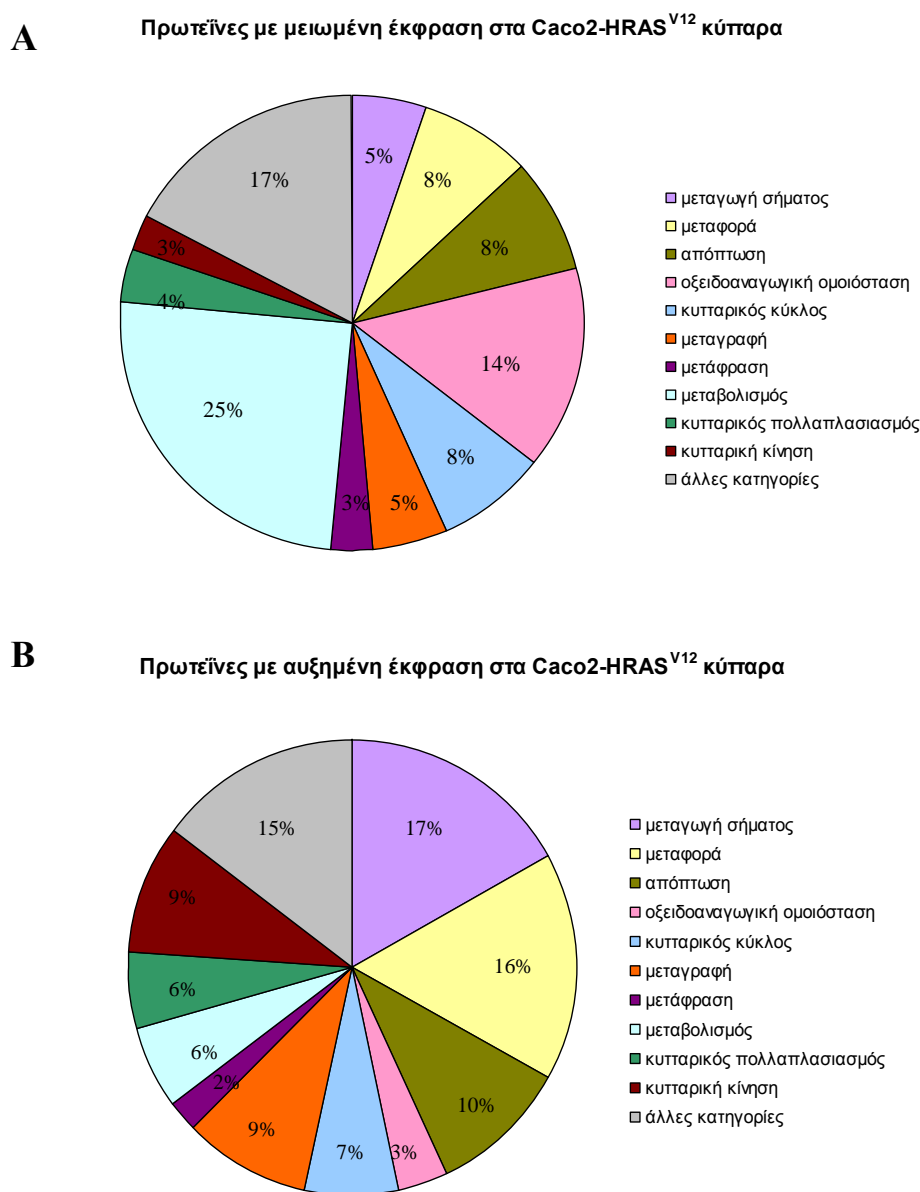
**B**

Πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα



**Εικόνα Α6:** Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται αρνητικά (Α) και θετικά (Β) από το ογκογονίδιο KRAS<sup>V12</sup> κατά το μετασχηματισμό των Caco2 κυττάρων

Θετικά ρυθμιζόμενες από το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>V12</sup> ταυτοποιήθηκαν 49 πρωτεΐνες, από τις οποίες οι 4 δεν είναι καταχωρημένες σε κάποια κατηγορία βιολογικής διεργασίας. Από τις υπόλοιπες 45, το 20% εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτεϊνών, RNA κλπ μέσα στο κύτταρο ή μεταξύ των κυττάρων, το 18% αφορά πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος, ακόμη ένα 18% ρυθμίζει την κυτταρική κίνηση ενώ το 20% δεν ανήκει σε καμία κατηγορία (εικόνα Α6 (B)).



**Εικόνα A7:** Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται αρνητικά (A) και θετικά (B) από το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>V12</sup> κατά το μετασχηματισμό των Caco2 κυττάρων

Από τη σύγκριση των πρωτεομικών προφίλ των Caco2 και των Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κυττάρων προέκυψαν 66 πρωτεΐνες να ρυθμίζονται αρνητικά από το ογκογονίδιο HRAS<sup>V12</sup>, από τις οποίες οι 7 δεν είναι καταχωρημένες σε κάποια κατηγορία βιολογικής διεργασίας του κυττάρου. Από τις υπόλοιπες 59, το 32% αφορά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, το 19% στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση ενώ το 22% αφορά άλλες κατηγορίες βιολογικών διεργασιών (εικόνα A7 (A)). Οι θετικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν 57, από τις οποίες οι 3 δεν είναι καταχωρημένες σε κάποια κατηγορία. Από τις υπόλοιπες 54, το 28% αφορά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος, το 26% στη μεταφορά πρωτεϊνών ενώ το 24% δεν ανήκει σε καμία κατηγορία (εικόνα A7 (B)).

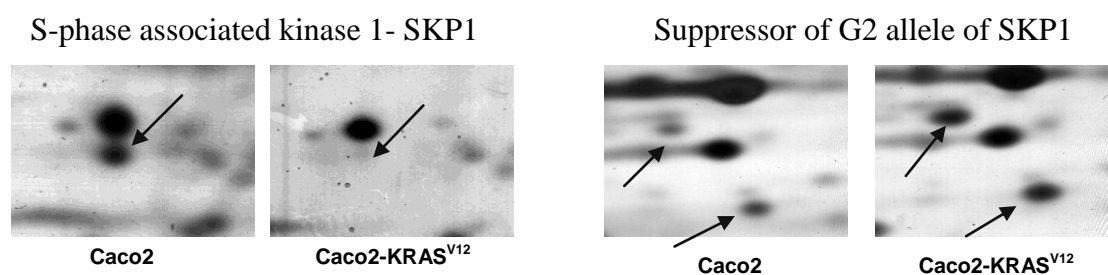
Συμπερασματικά, και τα δύο ογκογονίδια ρυθμίζουν αρνητικά κυρίως την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και θετικά την έκφραση πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στη μεταγωγή σήματος και τη μεταφορά πρωτεϊνών, RNA κλπ μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων αλλά και μεταξύ κυττάρων.

### 3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΔΕΙΧΝΕΙ ΤΟ ΔΙΑΚΡΙΤΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ KRAS<sup>V12</sup> ΚΑΙ HRAS<sup>V12</sup> ΣΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ Caco2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από μια σειρά κινασών εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (cyclin-dependent kinases - CDKs). Η ενεργότητα αυτών των ενζύμων ελέγχεται από πολλούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων της αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές υπομονάδες (κυκλίνες), φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης και αλληλεπίδρασης με αναστολείς (CDK inhibitors – CKIs) [238], [239]. Η ποσότητα των κυκλινών, των αναστολέων των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες και άλλων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου διακυμαίνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ως αποτέλεσμα περιοδικής πρωτεόλυσης [240]. Το πρωτεολυτικό μονοπάτι της ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος μεσολαβεί την αποικοδόμηση τέτοιων ρυθμιστικών πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ζωής και συνεπώς ελέγχει τις ενδοκυτταρικές τους συγκεντρώσεις [241], [242]. Παρά τη δομική ομοιότητα των κυκλινών, αποικοδομούνται σε διαφορετικό στάδιο του κυτταρικού κύκλου από το μονοπάτι της ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος,

υποδηλώνοντας ότι η διαδικασία ουβικουϊτινώσης για κάθε κυκλίνη είναι συγκεκριμένη και πολύ ευαίσθητη. Το μονοπάτι ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αποτελείται από δύο ξεχωριστά βήματα: την επισύναψη πολλών μορίων ουβικουϊτίνης στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα και την αποικοδόμηση της πολυ-ουβικουϊτινωμένης πρωτεΐνης από το 26S σύμπλεγμα του πρωτεασώματος [241], [242]. Η επικόλληση των μορίων της ουβικουϊτίνης στις πρωτεΐνες-στόχους μεσολαβείται από 3 τουλάχιστον ένζυμα: το ένζυμο που ενεργοποιεί την ουβικουϊτίνη (ubiquitin-activating enzyme – E1), το ένζυμο που προσκολλά την ουβικουϊτίνη (ubiquitin conjugating enzyme – E2) και τη λιγάση της ουβικουϊτίνης (E3). Τα συστατικά της E3 θεωρείται ότι είναι τα κυρίως υπεύθυνα για την εξειδικευμένη αναγνώριση καθενός από το πλήθος των πρωτεϊνών-στόχων.

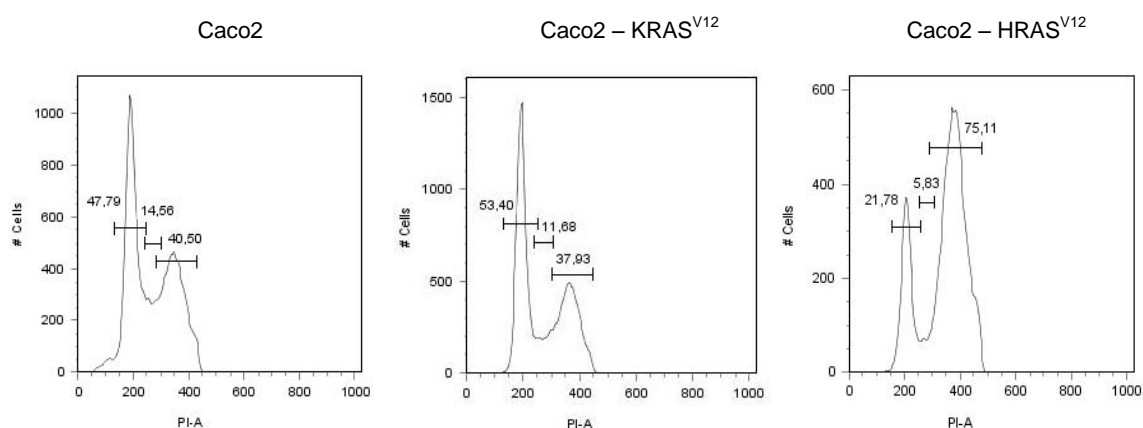
Η σύγκριση των πρωτεομικών προφίλ των Caco2 vs Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2 vs Caco2-HRAS<sup>V12</sup> οδήγησε στην ταυτοποίηση διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές φαίνεται ότι ρυθμίζονται με τον ίδιο τρόπο από τα δύο ογκογονίδια π.χ. η SKP1 (S-phase associated kinase 1) παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα στα μετασχηματισμένα κύτταρα ενώ αντίθετα οι δύο ισομορφές του καταστολέα της SUGT (Suppressor of G2 allele of SKP1) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση (**εικόνα A8**).



**Εικόνα A8:** Πηκτές δύο διαστάσεων που δείχνουν να ρυθμίζεται αρνητικά η έκφραση της SKP1 (αριστερά) και θετικά η έκφραση των δύο ισομορφών του καταστολέα της SUGT (δεξιά) στα *ras*-μετασχηματισμένα κύτταρα.

Αρκετές από τις υπομονάδες του πρωτεασώματος (proteasome subunits beta, alpha) ρυθμίζονται διαφορετικά από τα δύο ογκογονίδια καθώς και ενεργοποιητές του συμπλέγματος του πρωτεασώματος (proteasome activator complex). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα ογκογονίδια *RAS* επηρεάζουν τον κυτταρικό

κύκλο με διαφορετικό τρόπο το καθένα. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τον διαφορετικό ρόλο των δύο ογκογονιδίων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αναλύσαμε τις τρεις κυτταρικές σειρές με κυτταρομετρία ροής και χρώση με propidium iodide. Τα αποτελέσματα (εικόνα A9) δείχνουν ότι το ογκογονίδιο  $KRAS^{V12}$  δεν επιδρά σημαντικά στον κυτταρικό κύκλο. Αυξάνει ελάχιστα την παραμονή των κυττάρων στην G1 φάση. Αντίθετα, το ογκογονίδιο  $HRAS^{V12}$  αυξάνει τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων, με αποτέλεσμα ο μεγαλύτερος πληθυσμός να βρίσκεται στην φάση G2/M.

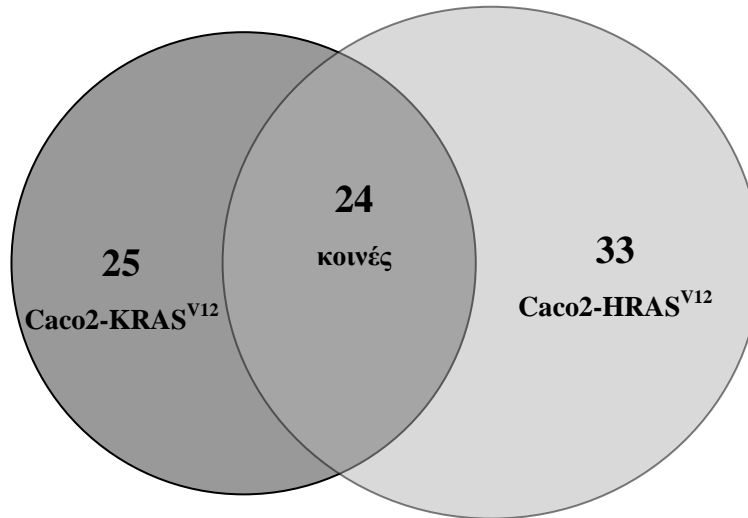
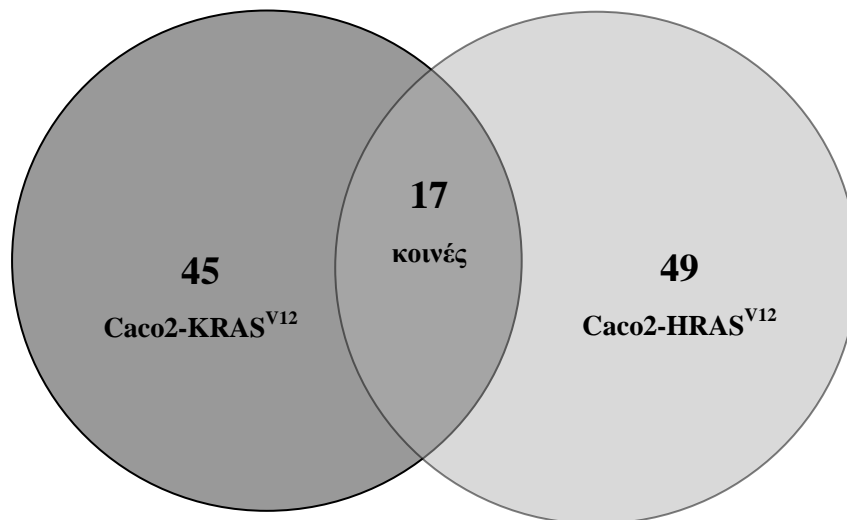


**Εικόνα A9:** Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής των Caco2 κυττάρων και των μετασχηματισμένων από τα ογκογονίδια  $RAS$ , Caco2- $KRAS^{V12}$  και Caco2- $HRAS^{V12}$

### 3.4 ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ $RAS$ ( $KIRSTEN$ ΚΑΙ $HARVEY$ ) ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΟΜΟΙΑ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΙΑΣ ΟΜΑΔΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα πρωτεομικά προφίλ των δύο μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών από τα ογκογονίδια  $RAS$ , Caco2- $KRAS^{V12}$  και Caco2- $HRAS^{V12}$ , εμφάνισαν ομοιότητες στις πρωτεΐνες που ρυθμίστηκαν διαφορετικά μετά το μετασχηματισμό. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκαν 24 κοινές πρωτεΐνες με θετική ρύθμιση στην έκφρασή τους και 17 πρωτεΐνες με αρνητική ρύθμιση της έκφρασής τους (εικόνα A10).



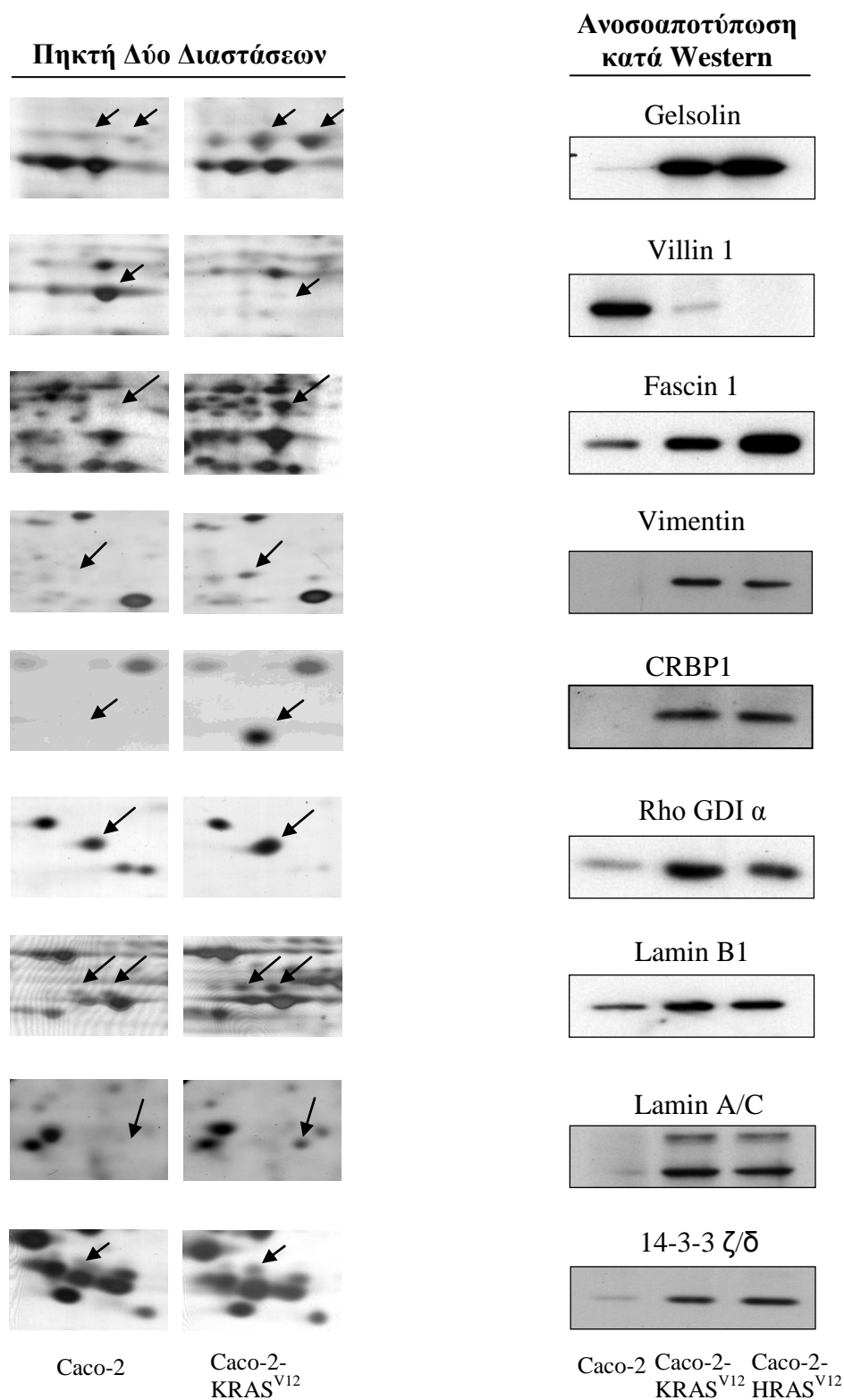
**A. Θετικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες****B. Αρνητικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες**

**Εικόνα A10:** Ο αριθμός των πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από τα ογκογονίδια RAS στα αντίστοιχα μετασηματισμένα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα συγκριτικά με τα αρχικά Caco2. Περίπου το 45% των πρωτεϊνών που αυξάνουν την έκφρασή τους υπόκεινται σε θετική ρύθμιση και από τα δύο ογκογονίδια RAS, ενώ το 25% των πρωτεϊνών που παρουσιάζει μειωμένη έκφραση, ρυθμίζεται αρνητικά και από τα δύο ογκογονίδια.

### 3.5 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Ο εντοπισμός ενός στίγματος ως διαφορά κατά τη σύγκριση πηκτών δύο διαστάσεων δεν αντιστοιχεί πάντα σε μία πρωτεΐνη που επηρεάζεται η έκφρασή της από τον χειρισμό (π.χ. μετασχηματισμός με κάποιο ογκογονίδιο, εφαρμογή ενός θεραπευτικού παράγοντα κλπ) που έχει γίνει στο δεύτερο δείγμα.

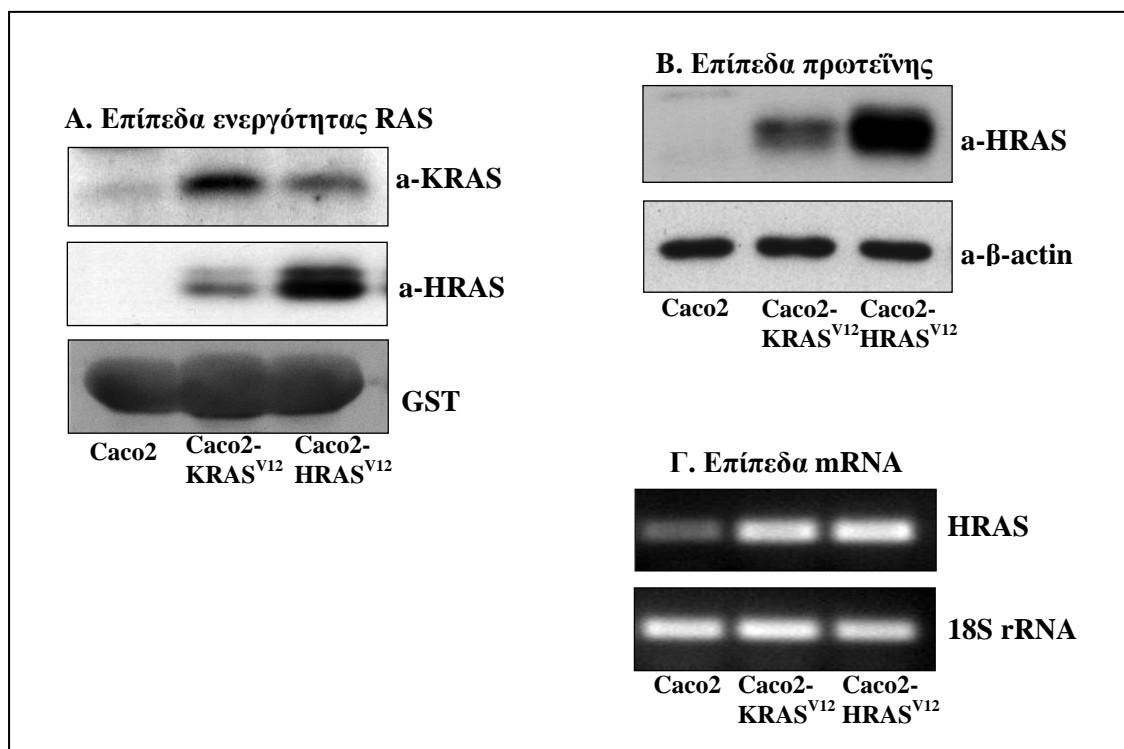
Η πρωτεΐνη που ταυτοποιείται από την ανάλυση του στίγματος μπορεί να έχει υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση, οξείδωση της κυστεΐνης κλπ που αλλάζουν το ισοηλεκτρικό σημείο της, με αποτέλεσμα να εστιάζει σε διαφορετικό σημείο ή άλλες τροποποιήσεις όπως γλυκοσυλίωση ή ακετυλίωση που αλλάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να εντοπίζεται σε υψηλότερα μοριακά βάρη. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με άλλες πιο κλασικές τεχνικές όπως είναι η ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην παρούσα μελέτη, η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται (ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και χρώση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο) δεν είναι απόλυτα ποσοτική και μικρές διαφορές στην ένταση των στιγμάτων πρέπει να επιβεβαιωθούν, προκειμένου να αποφανθούμε για διαφορεικά εκφραζόμενα πρωτεΐνη. Στην **εικόνα A11** παρουσιάζονται παραδείγματα στιγμάτων που αποκόπηκαν ως διαφορές από την σύγκριση των Caco2 και Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων και η επιβεβαίωση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας.



**Εικόνα A11:** Επιβεβαίωση των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην αριστερή στήλη φαίνεται η περιοχή της πηκτής δύο διαστάσεων όπου σημειώνεται με βέλος το στίγμα που αποκόπτεται ως διαφορά. Για λόγους συντομίας, παρουσιάζονται οι περιοχές από τις πηκτές που έχει αναλυθεί το πρωτεομικό προφίλ των Caco2 και Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων. Στη δεξιά στήλη, σε ολικά εκχυλίσματα των τριών κυτταρικών σειρών, επιβεβαιώνεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western η διαφορική έκφραση της πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί.

### 3.6 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ *KRAS*<sup>V12</sup> ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *HRAS*

Η διαπίστωση ότι η έκφραση πολλών πρωτεϊνών αλλάζει με παρόμοιο τρόπο στα μετασχηματισμένα κύτταρα είτε από το *KRAS*<sup>V12</sup> είτε από το *HRAS*<sup>V12</sup>, θα μπορούσε να εξηγηθεί με δύο τρόπους: α) εξαιτίας της ομολογίας μεταξύ των δύο ογκογονιδίων και τον κοινό τρόπο δράσης, συμπεριλαμβανομένης και της ενεργοποίησης κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών και β) ένα ογκογονίδιο μπορεί να ενεργοποιήσει την ενδογενή μορφή ενός άλλου γονιδίου, η οποία προκαλεί την εκδήλωση παρόμοιων αποκρίσεων με την μεταλλαγμένη μορφή. Η δεύτερη υπόθεση οδήγησε στην ανάλυση τόσο των επιπέδων της ενδογενούς *HRAS* όσο και της ενεργότητας της GTPάσης στα *Caco2-KRAS*<sup>V12</sup> κύτταρα. Η τελευταία έγινε με τη χρήση σφαιριδίων με ακινητοποιημένη την περιοχή της RAF-1 που προσδένει τις RAS (RAS-binding domain). Με τα σφαιρίδια αυτά κατακρημνίζονται από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα οι ενεργές RAS (RAS-GTP) και στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωση κατά Western ανιχνεύονται τα επίπεδα της κάθε ισομορφής. Διαπιστώθηκε τόσο αυξημένη ενεργότητα όσο και υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *HRAS* στα *Caco2-KRAS*<sup>V12</sup> κύτταρα σε σχέση με τα αρχικά *Caco2*. Τα επίπεδα του mRNA της *HRAS* βρέθηκαν, επίσης, αυξημένα. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ενεργότητας της ενδογενούς *KRAS* ή υψηλά επίπεδα στα *Caco2-HRAS*<sup>V12</sup> κύτταρα (εικόνα A12). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το *KRAS*<sup>V12</sup> μπορεί άμεσα είτε να ρυθμίσει τη μεταγραφή του ενδογενούς *HRAS* γονιδίου ή να σταθεροποιήσει το mRNA του και ταυτόχρονα να αυξήσει την ενεργότητα GTPάσης της *HRAS*.

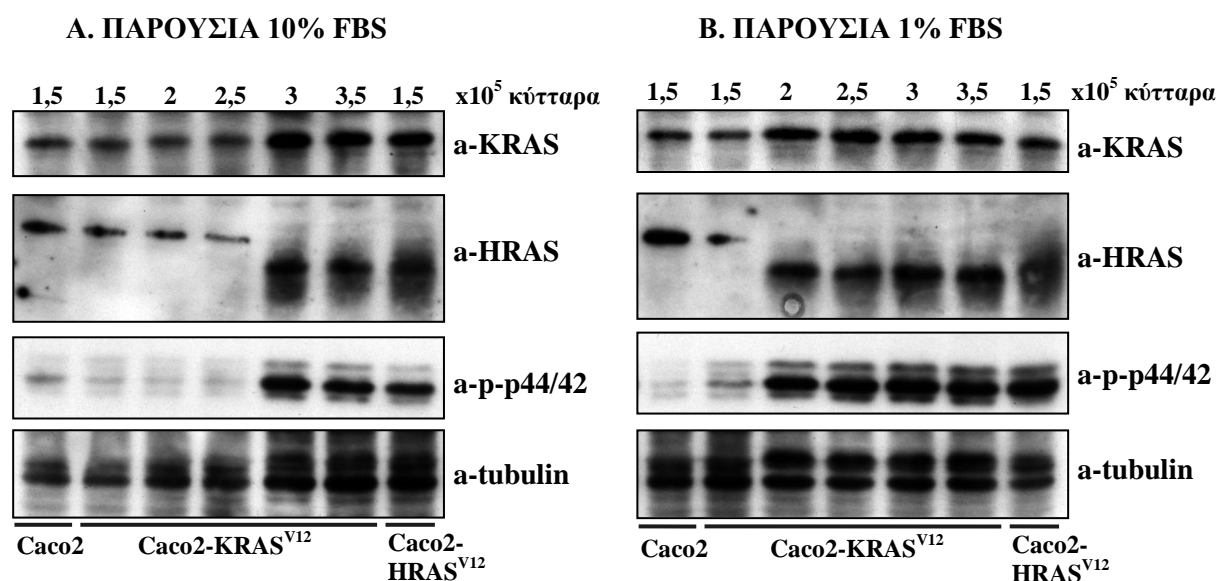


**Εικόνα A12:** Το ογκογονίδιο KRAS<sup>V12</sup> ρυθμίζει τα επίπεδα της ενδογενούς HRAS. Α. Κατακρήμνιση με σφαιρίδια γλουταθειόνης GST-RBD της ενεργής μορφής των KRAS και HRAS Β. Ανοσοαποτύπωση κατά Western των επιπέδων της HRAS. Η β-actin χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφάσης που δείχνει τα επίπεδα του mRNA της HRAS. Τα επίπεδα του 18S rRNA χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ίσης ποσότητας RNA. Τα επίπεδα ενεργότητας των ras, πρωτεΐνης και mRNA της HRAS έχουν προσδιοριστεί και στις τρεις κυτταρικές σειρές, όπως φαίνεται.

### 3.7 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HRAS ΣΤΑ Caco2-KRAS<sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΟΡΟΥ ΣΤΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι RAS-μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες στην καλλιέργεια. Ως μετασηματισμένα – καρκινικά κύτταρα δεν εμφανίζουν αναστολή της ανάπτυξής τους όταν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους (contact inhibition), παρόλα αυτά η πυκνότητά τους δεν πρέπει να ξεπερνά το 80%. Τα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές πυκνότητες, προκειμένου να διαπιστωθεί αν αυτό επηρεάζει την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης και συνεπώς την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Σε τρυβλία 6 θέσεων τοποθετήθηκαν  $1.5-3.5 \times 10^5$

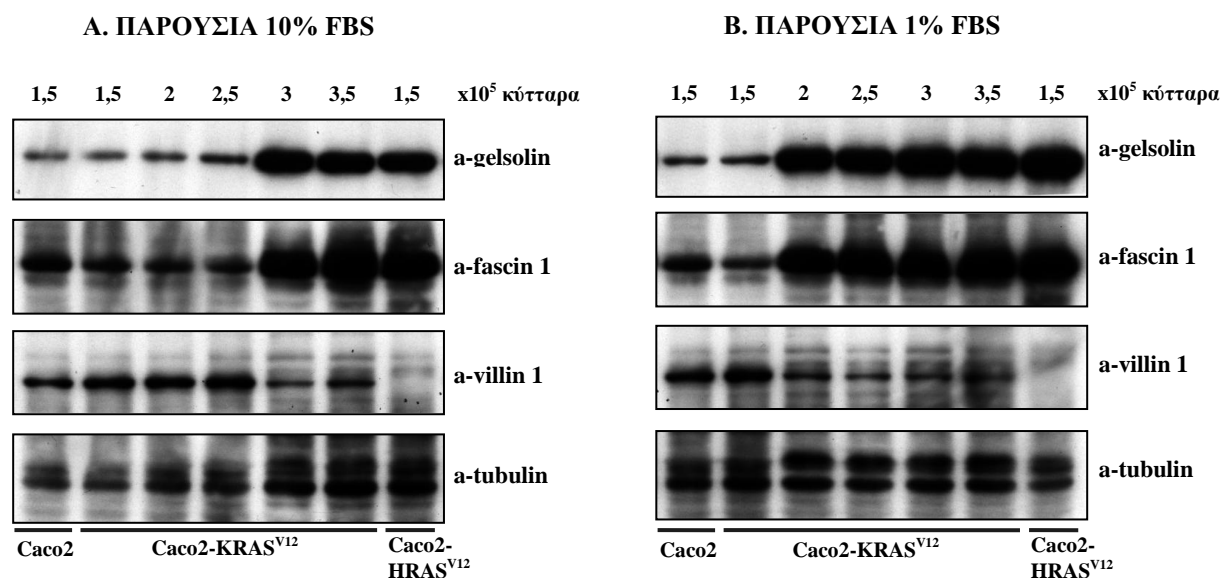
Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα και επωάστηκαν για 2 ημέρες, παρουσία 10% και 1% FBS στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Στην **εικόνα A13 (A)** φαίνεται ότι παρουσία 10% FBS απαιτείται μεγαλύτερη πυκνότητα του κυτταρικού πληθυσμού προκειμένου να εκφραστεί η ογκοπρωτεΐνη KRAS, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την ενδογενή HRAS και το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK. Σε συνθήκες στέρησης ορού (**εικόνα A13 (B)**), τα προαναφερθέντα γεγονότα συμβαίνουν σε μικρότερη πυκνότητα καλλιέργειας.



**Εικόνα A13:** Τα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές πυκνότητες παρουσία 10% FBS (A) και 1% FBS (B) για 2 ημέρες. Η ενεργοποίηση της ενδογενούς H-ras και του μονοπατιού των MAPK κινασών απαιτεί υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων παρουσία 10% FBS, ενώ σε συνθήκες στέρησης ορού η ενεργοποίηση συμβαίνει στα 2/3 της προηγούμενης πυκνότητας.

Στις ίδιες συνθήκες, ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις πρωτεΐνες gelsolin, fascin 1 και villin 1 έδειξε ότι η έκφρασή τους ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της KRAS με βάση την πυκνότητα της κυτταροκαλλιέργειας και την παρουσία ορού (**εικόνα A14 (A, B)**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις αντίστοιχες πυκνότητες καλλιέργειας τα Caco2 και τα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> δεν παρουσιάζουν καμία μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK. Η στέρηση ορού δεν αλλάζει το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών και ενεργοποίησης των μονοπατιών.



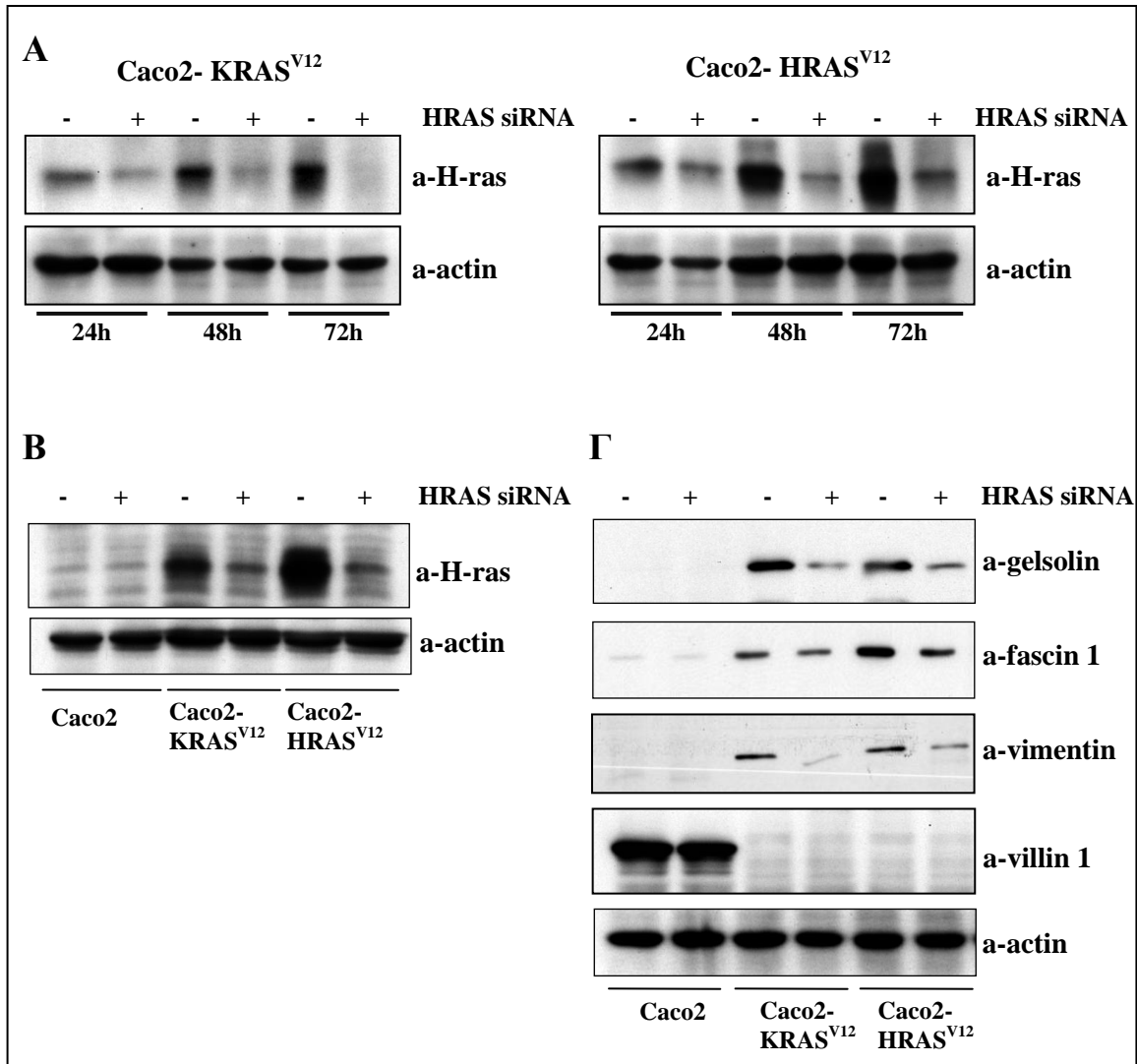
**Εικόνα A14:** Τα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές πυκνότητες παρουσία 10% FBS (A) και 1% FBS (B) για 2 ημέρες. Η ενεργοποίηση της ενδογενούς H-ras και του μονοπατιού των MAPK κινασών απαιτεί υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων παρουσία 10% FBS, ενώ σε συνθήκες στέρησης ορού η ενεργοποίηση συμβαίνει στα 2/3 της προηγούμενης πυκνότητας.

### 3.8 Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HRAS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA) ΑΝΤΙΣΤΡΕΦΕΙ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΩΝ Caco2-KRAS<sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης HRAS είναι υπεύθυνη για τις κοινές πρωτεομικές αλλαγές των δύο μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών, Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και Caco2-HRAS<sup>V12</sup>, έγινε γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης αυτής με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNAs).

Το μίγμα των ολιγονουκλεοτιδίων ήταν εμπορικά διαθέσιμο και σχεδιασμένο ειδικά για το mRNA της HRAS του ανθρώπου. Πειραματικά, είχε ήδη χρησιμοποιηθεί από άλλη ερευνητική ομάδα, η οποία έδειξε την εξειδίκευσή του για την HRAS χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των KRAS και NRAS [237]. Η εισαγωγή του στα κύτταρα έγινε με παροδική επιμόλυνση, με τη χρήση του αντιδραστηρίου HiPerFect

(Qiagen) και ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητά του μετά από 24, 48 και 72 ώρες στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές (εικόνα A15 (A)).



**Εικόνα A15:** Γονιδιακή αποσιώπηση της *H-ras* στα *Caco2-KRAS<sup>V12</sup>* κύτταρα. **A.** Έλεγχος αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης των μετασχηματισμένων κυττάρων με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA που στοχεύουν το mRNA της *H-ras* για 24, 48 και 72 ώρες. **B.** Παροδική επιμόλυνση των *Caco2* και των *RAS*-μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών με ολιγονουκλετίδια που στοχεύουν την *H-ras* για 72 ώρες. Τα επίπεδα της *H-ras* προσδιορίζονται με ανοσοαποτύπωση κατό Western. Ο έλεγχος της ισοφόρτωσης των δειγμάτων γίνεται με προσδιορισμό των επιπέδων της ακτίνης. **Γ.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνών που σημειώνονται μετά από γονιδιακή αποσιώπηση της *H-ras*. Τα *Caco2* κύτταρα χρησιμοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας ενώ τα *Caco2-HRAS<sup>V12</sup>* ως θετικός μάρτυρας.

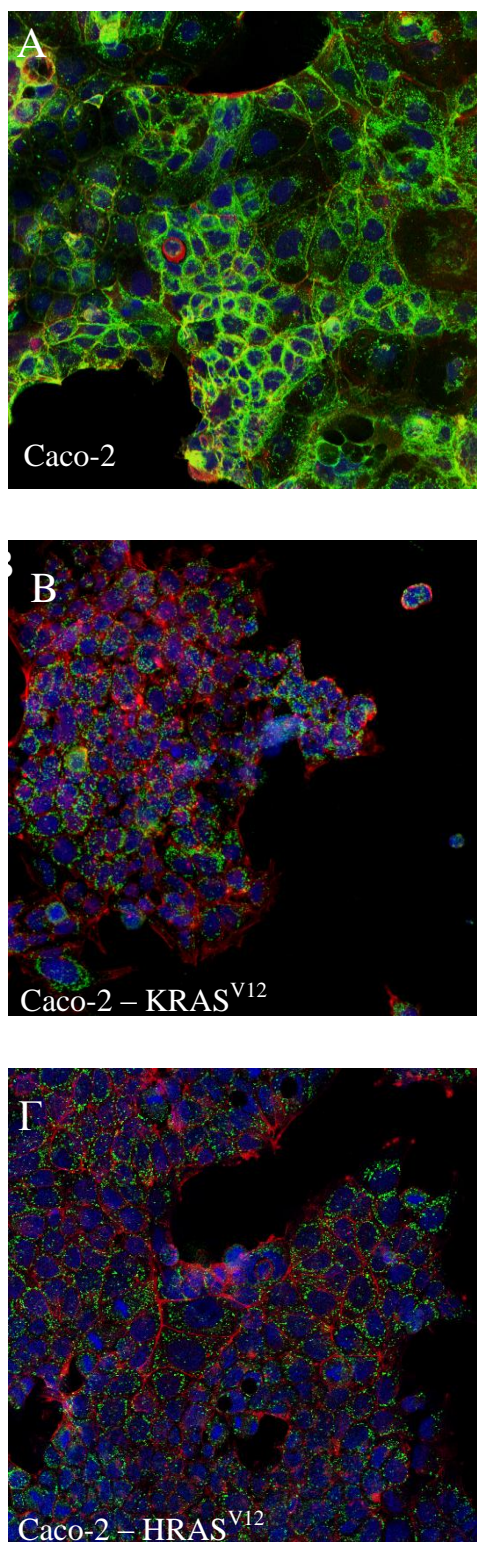
Καταλληλότερο θεωρήθηκε το διάστημα των 72 ωρών για την εκτέλεση των περαιτέρω πειραμάτων, γιατί η έκφραση της πρωτεΐνης HRAS ήταν υψηλότερη στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τα ολιγονουκλετίδια ελέγχου και η γονιδιακή



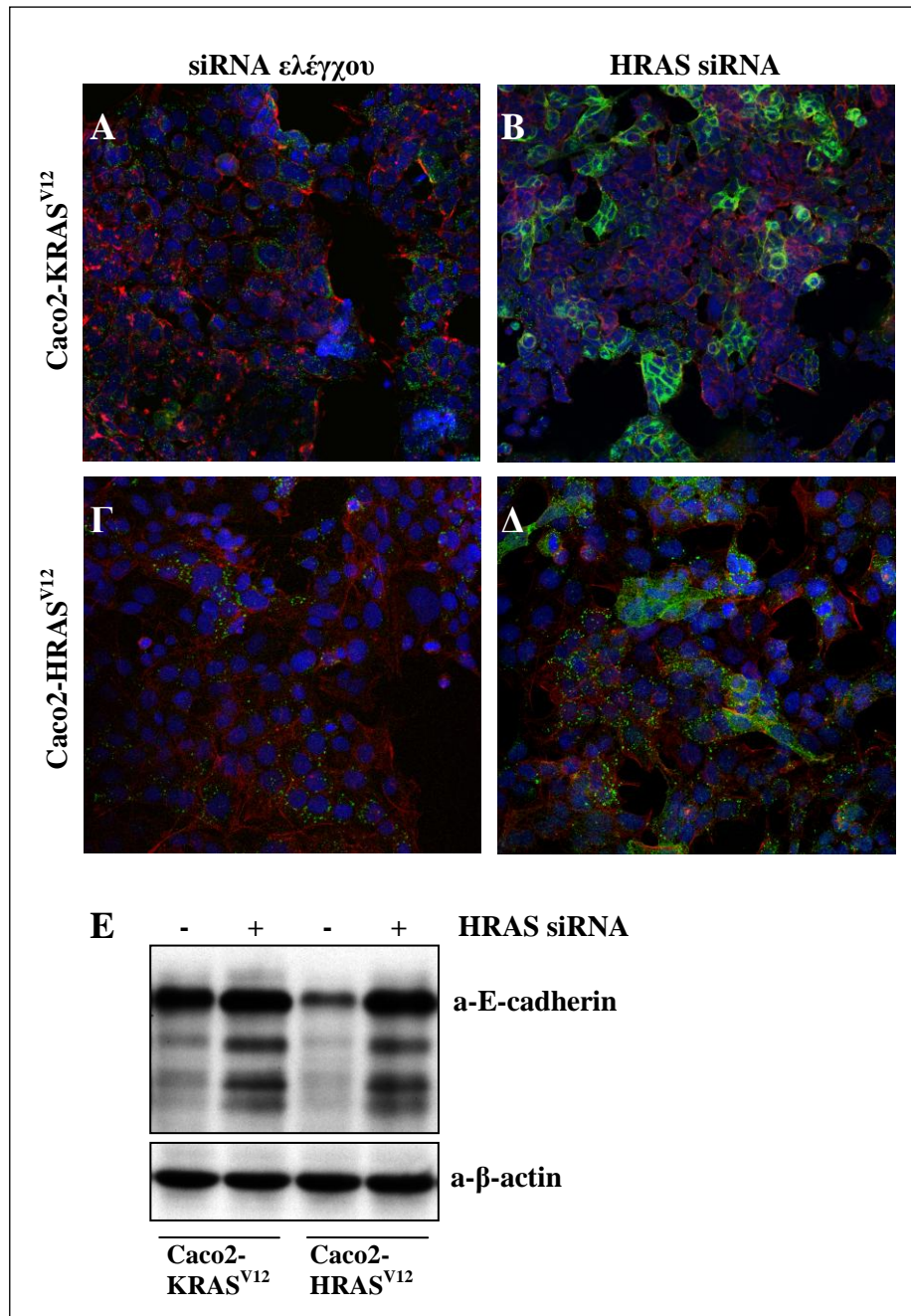
αποσιώπησή της πιο αποτελεσματική (**εικόνα A15 (B)**). Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν τα επίπεδα κάποιων από τις πρωτεΐνες, οι οποίες βρέθηκαν να εκφράζονται περισσότερο μετά τον μετασχηματισμό των Caco2 κυττάρων από τα *RAS* ογκογονίδια. Μετά την γονιδιακή αποσιώπηση της *HRAS*, τα επίπεδα των πρωτεϊνών vimentin, fascin 1 και gelsolin μειώθηκαν σημαντικά και στις δύο μετασχηματισμένες σειρές, ενώ τα επίπεδα της villin 1 δεν επανήλθαν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα (**εικόνα A15 (Γ)**).

### **3.9 Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ *HRAS* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΙ ΤΗ ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ Caco2-KRAS<sup>V12</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Είναι γνωστό ότι τα ογκογονίδια *RAS* αυξάνουν την κινητικότητα, τη διεισδυτικότητα και τη μεταστατικότητα των κυττάρων επηρεάζοντας την έκφραση πρωτεϊνών κυρίως του κυτταροσκελετού, όπως η gelsolin [209]. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης καθώς και η ανοσοαποτύπωση κατά Western έχει επιβεβαιώσει τη θετική ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα μελέτης του ΚΠΕ. Στενά συνδεδεμένη με τις παραπάνω ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων είναι η αρνητική ρύθμιση της επιθηλιακής καντερίνης (*E-cadherin*). Η επιθηλιακή καντερίνη είναι μια πρωτεΐνη των διακυτταρικών συνδέσμων (*adherens junctions*) και εντοπίζεται στις επαφές των κυττάρων. Αυξημένη έκφρασή της έχει συνδεθεί με μειωμένη ικανότητα διείσδυσης των κυττάρων και είναι πρωταρχικής σημασίας στην παγίωση της μεταστατικής δυναμικής των μετασχηματισμένων κυττάρων από ογκογονίδια. Τα Caco2 κύτταρα έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της επιθηλιακής καντερίνης ενώ τα μετασχηματισμένα από τα *RAS* ογκογονίδια κύτταρα εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα, ενδεικτικό της αυξημένης μεταστατικής δυνατότητας. Η χρήση ανοσοφθορισμού και η ανάλυση με μικροσκοπία συνεστιακής απεικόνισης έδειξε εντοπισμό της επιθηλιακής καντερίνης στα σημεία προσκόλλησης των Caco2 κυττάρων, ενώ στα μετασχηματισμένα κύτταρα έδειξε μείωση σε πρωτεϊνικό επίπεδο και απώλεια του εντοπισμού από τα σημεία επαφής των κυττάρων (**εικόνα A16**).



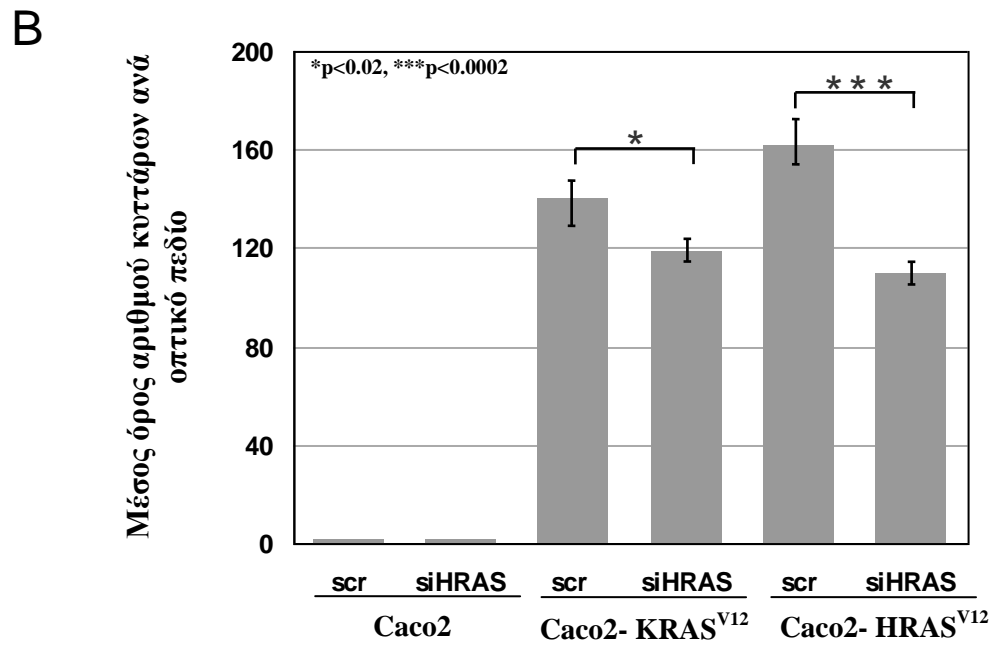
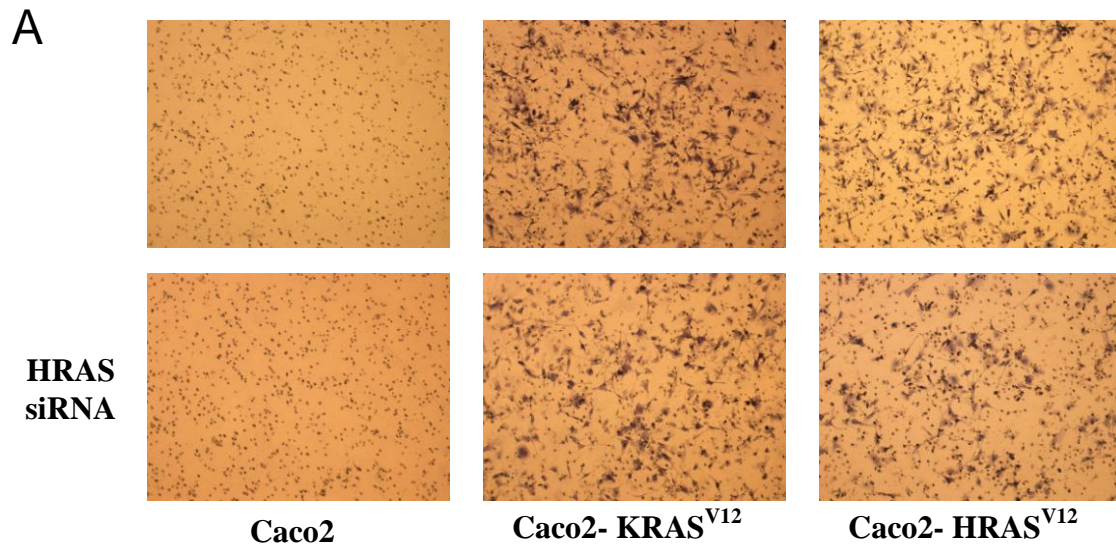
**Εικόνα A16:** Τα ογκογονίδια *RAS* ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της επιθηλιακής καντερίνης. Προβολές διαδοχικών επιπέδων από μικροσκοπία συνεστιακής απεικόνισης δείχνουν με ανοσοφθορισμό την επιθηλιακή καντερίνη (πράσινο) και την φαλλοϊδίνη (κόκκινο), ενώ οι πυρήνες των κυττάρων είναι βαμμένοι με DAPI (μπλε) στα Caco2 (A), στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> (B) και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> (Γ) κύτταρα.



**Εικόνα A17:** Η γονιδιακή αποσιώπηση της ενδογενούς HRAS στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> αποκαθιστά τα επίπεδα έκφρασης και τον κυτταρικό εντοπισμό της επιθηλιακής καντερίνης. Προβολές διαδοχικών επιπέδων μικροσκοπίας συνεστιακής απεικόνισης ανοσοφθορισμού της επιθηλιακής καντερίνης στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> (A, B) και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> (Γ, Δ) μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων για 72 ώρες με ολιγονουκλεοτίδια ελέγχου (A, Γ) και ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν το mRNA της HRAS (B, Δ). E. Ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνικών επιπέδων της επιθηλιακής καντερίνης στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων για 72 ώρες με ολιγονουκλεοτίδια ελέγχου και ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν το mRNA της HRAS

Η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS τόσο στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> όσο και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> αύξησε τα επίπεδα της επιθηλιακής καντερίνης και αποκατέστησε μερικώς τον εντοπισμό της στην περιφέρεια του κυττάρου. Η αλλαγή στην κατανομή της επιθηλιακής καντερίνης, από στικτή κυτταροπλασματική σε συνεχή μεταξύ των κυτταρικών επαφών, παρατηρήθηκε και στις δύο μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές, σε μεγαλύτερο ίσως ποσοστό στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα. Συνεπώς, η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS απεκατέστησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της επιθηλιακής καντερίνης και τον σωστό εντοπισμό της τόσο στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> όσο και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα (εικόνα A17). Τα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρική σειρά θετικού ελέγχου, εφόσον είναι γνωστό ότι το ογκογονίδιο HRAS μειώνει τα επίπεδα της επιθηλιακής καντερίνης τόσο σε κυτταρικές σειρές ΚΠΕ [243] όσο και σε άλλες καρκινικές σειρές [244] ή μη [245].

Η τεχνολογία των μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων mRNA για τη γονιδιακή αποσιώπηση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε και για την αξιολόγηση της συμβολής της αυξημένης ενδογενούς HRAS στην ικανότητα διείσδυσης των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων και συνεπώς, στη μεταστατική δυναμική τους. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 60% και επιμολύνθηκαν παροδικά με ολιγονουκλεοτίδια ελέγχου και ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν την HRAS. Προκειμένου να χαρακτηριστεί η ικανότητα κυτταρικής διείσδυσης χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* δοκιμασία με Matrigel, όπου τα κύτταρα που διαθέτουν διεισδυτική ικανότητα αποικοδομούν τα συστατικά του Matrigel και διαπερνούν τους πόρους της μεμβράνης, μεταναστεύοντας στην κάτω επιφάνειά της. Η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS μείωσε τον αριθμό των κυττάρων που μεταναστεύουν και στις δυο μετασχηματισμένες σειρές. Το αποτέλεσμα ήταν πιο εντυπωσιακό στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα, εφόσον έχουν μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα. Και οι δύο κυτταρικές σειρές, ωστόσο, μείωσαν τη μεταναστευτικότητά τους στα ίδια περίπου επίπεδα (εικόνα A18), υποδηλώνοντας ότι η διεισδυτική δραστηριότητα που απέμεινε είναι ανεξάρτητη της δράσης της RAS.

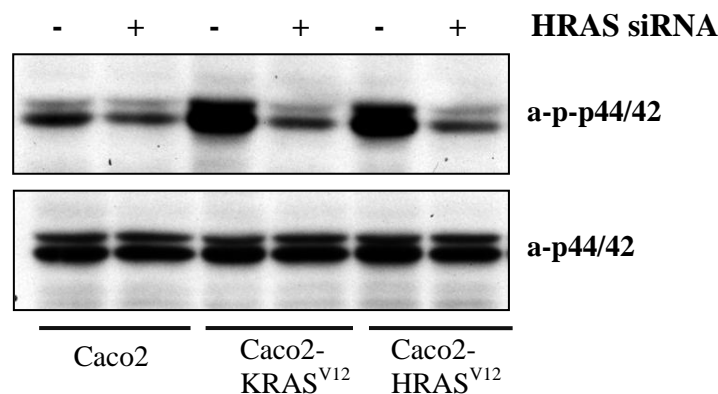




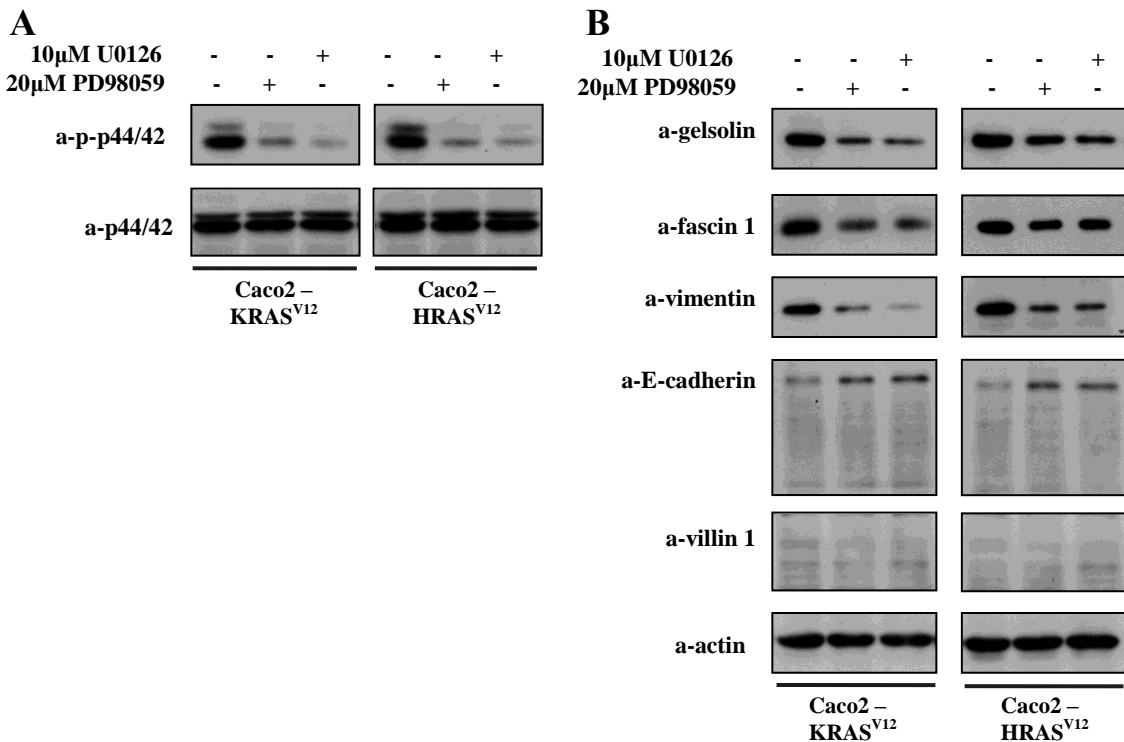
**Εικόνα A18:** Η επίδραση της γονιδιακής αποσιώπησης της HRAS στην *in vitro* κυτταρική διείσδυση των μετασχηματισμένων κυττάρων. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της *in vitro* δοκιμής της κυτταρικής διείσδυσης στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων για 72 ώρες με ολιγονουκλεοτίδια ελέγχου και ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν το mRNA της HRAS Β. Ποσοτικοποίηση πολλαπλών μετρήσεων αποδίδοντας τον μέσο όρο κυττάρων ανά οπτικό πεδίο. Τα Caco2 κύτταρα, σε καμία περίπτωση, δεν μπόρεσαν να αποικοδομήσουν το Matrigel<sup>TM</sup> και να διαπεράσουν τους πόρους της μεμβράνης.

### 3.10 ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ ΜΕΣΟΛΑΒΕΙ ΣΤΗ ΘΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

Η γονιδιακή αποσιώπηση της ενδογενούς HRAS με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA μειώνει τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 (p42/44) τόσο στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> όσο και στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα (**εικόνα A19**). Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το μονοπάτι των MAP κινασών μεσολαβεί καθοδικά της HRAS στη θετική ρύθμιση της έκφρασης των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών που ήδη μελετήθηκαν, χρησιμοποιήσαμε τους χημικούς αναστολείς PD98059 και U0126 στα μετασχηματισμένα κύτταρα από τα ογκογονίδια RAS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τους αναστολείς για το ίδιο χρονικό διάστημα που εφαρμόστηκε και η επιμόλυνσή τους με τα ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν την HRAS (72 ώρες). Η χημική σταθερότητα των συγκεκριμένων αναστολέων επέτρεψε τη χρήση τους για το μεγάλο αυτό χρονικό διάστημα και η φωσφορυλίωση των ERK1/2 ελαττώθηκε κατά 90% (**εικόνα A20 (A)**). Η μειорύθμιση της έκφρασης των gelsolin, fascin 1 και vimentin, η αύξηση των επιπέδων της επιθηλιακής καντερίνης καθώς και η μη επαναφορά των επιπέδων της villin 1 ήταν εφάμιλλη της γονιδιακής αποσιώπησης της ενδογενούς HRAS (**εικόνα A20 (B)**).



**Εικόνα A19:** Αναστολή της φωσφορυλίωσης του μονοπατιού των MAP κινασών μετά από τη γονιδιακή αποσιώπηση της ενδογενούς *H-ras*



**Εικόνα A20:** (A) Αναστολή του μονοπατιού των MAP κινασών με τη χρήση χημικών αναστολέων στα RAS-μετασχηματισμένα κύτταρα (B) Μείωση των επιπέδων έκφρασης της *gelsolin*, της *fascin 1* και της *vimentin*, αύξηση των επιπέδων της επιθηλιακής καντερίνης και μη ανιχνεύσιμη αλλαγή στα επίπεδα της *villin 1* μετά τη χρήση των αναστολέων του μονοπατιού των MAP κινασών.

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

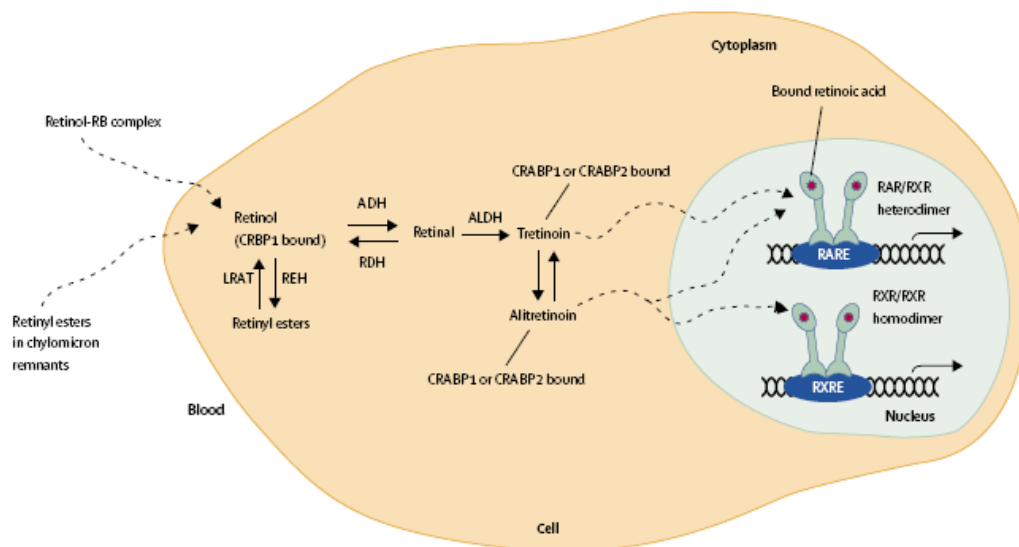


Μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *KRAS* απαντώνται περίπου στο 50% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι πιο συνηθισμένες μεταλλάξεις είναι αυτές που οδηγούν στην παραγωγή πρωτεΐνης με ελαττωματική λειτουργικότητα GTPασης, με αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη RAS να βρίσκεται συνεχώς στην ενεργή μορφή και να ενεργοποιεί ακατάπαυστα σηματοδοτικά μονοπάτια. Προκειμένου η μεταλλαγμένη μορφή του *KRAS* να προκαλέσει μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων και να τα μετατρέψει σε καρκινικά, είναι απαραίτητο να μη λειτουργούν κάποια ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το *APC* και το *TP53* [246]. Στο κυτταρικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε για την παρούσα μελέτη, η κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου Caco2, φέρει μεταλλάξεις στο *APC* και το *TP53*, με αποτέλεσμα την έκφραση «μειωμένου μήκους» (truncated) ή μη λειτουργικής πρωτεΐνης αντίστοιχα.

Η σειρά αυτή μετασχηματίστηκε από τα μεταλλαγμένα ογκογονίδια *KRAS*<sup>V12</sup> και *HRAS*<sup>V12</sup>. Η σύγκριση των πρωτεομικών προφίλ των δύο μετασχηματισμένων σειρών σε σχέση με τα Caco2 έδειξε αλλαγές στην έκφραση περίπου 200 πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες που επιτελεί ένα κύτταρο. Αλλαγές στην έκφραση των αννεξινών, των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και των κυτταροσκελετικών υποστρωμάτων των κασπασών (όπως είναι η gelsolin) μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και της επιβίωσης του καρκινικού κυτάρου, ενώ αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως οι υπομονάδες του πρωτεασώματος και ενεργοποιητές του συμπλέγματος του πρωτεασώματος, μπορούν να συσχετιστούν με την αυξημένη δυναμική πολλαπλασιασμού των RAS-μετασχηματισμένων κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η αρνητική ρύθμιση της villin 1, η οποία είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου, είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι τα Caco2 κύτταρα, μετά το μετασχηματισμό τους από τα ογκογονίδια *RAS*, χάνουν τον επιθηλιακό τους χαρακτήρα. Επιπλέον, θετική ρύθμιση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως είναι η fascin 1 και η vimentin, αλλάζουν τον πολυμερισμό των ινιδίων της ακτίνης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της κυτταρικής κίνησης και των μεταστατικών ιδιοτήτων των μετασχηματισμένων κυττάρων. Γενικότερα, φαίνεται ότι αλλάζει η ρύθμιση στην έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό (γλυκόζης, λιπιδίων, αμινοξέων κλπ), στη μεταφορά βιολογικών μορίων (πρωτεϊνών, RNA κλπ) μεταξύ

των υποκυτταρικών διαμερισμάτων αλλά και μέσα ή έξω από το κύτταρο, στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και στη μεταγωγή σήματος.

Η τελευταία αυτή κατηγορία πρωτεϊνών πιθανόν να έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δίνοντας πληροφορίες για νέα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις μεταλλαγμένες KRAS και HRAS, εκτός από τα γνωστά όπως το μονοπάτι των MAPK και της PI3K, και παίζουν ρόλο στη διαδικασία του μετασχηματισμού των κυττάρων και της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, μια από τις πρωτεΐνες που ρυθμίζεται θετικά με την έκφραση των ογκογονιδίων στα Caco2 κύτταρα είναι η CRABP2 (cellular retinoic acid-binding protein 2). Η πρωτεΐνη αυτή προσδένει το ρετινοϊκό οξύ και το μεταφέρει από το κυτταρόπλασμα στους υποδοχείς του στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί μεταγραφικά πολλά γονίδια. Η θετική ρύθμιση της CRBP1 (cellular retinol-binding protein 1), μιας πρωτεΐνης που αποθηκεύει τη ρετινόλη στο κυτταρόπλασμα και τη διαθέτει σε ένζυμα μετατροπής που την οξειδώνουν σε ρετιναλδεΐδη και στη συνέχεια σε ρετινοϊκό οξύ (**εικόνα Σ1**), ενισχύει περισσότερο την ιδέα για το ρόλο της σηματοδότησης του ρετινοϊκού οξέος στην καρκινογένεση



**Εικόνα Σ1:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι των ρετινοειδών. Εξωγενής ρετινόλη ή ρετινυλικοί εστέρες εισέρχονται στο κύτταρο και αποθηκεύονται παραμένοντας σε μια ισορροπία συγκέντρωσης. Όταν υπάρχει σχετική ανάγκη, η ισορροπία μετατοπίζεται προς σχηματισμό ρετινόλης, η οποία προσδένεται στην CRBP1 (cellular retinol-binding protein 1) και διατίθεται προς οξείδωση σε ρετινοϊκό οξύ. Η CRABP2 (cellular retinoic acid-binding protein 2) μεταφέρει το ρετινοϊκό οξύ στον πυρήνα, όπου προσδένεται στους υποδοχείς του RAR και RXR, που ενεργοποιούν μεταγραφικά γονίδια αφού προσδεθούν στα RARE στοιχεία τους.

του παχέος εντέρου. Ο ρόλος του ρετινοϊκού οξέος είναι γνωστός στη διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων [247] και άλλων διαδικασιών, αλλά προς το παρόν δεν έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση των RAS και τον ΚΠΕ.

Διάφορες πρωτεομικές μελέτες έχουν καταδείξει πρωτεΐνες είτε ως θεραπευτικούς στόχους είτε ως δείκτες για τη διάγνωση, τον προσδιορισμό του σταδίου και την πρόγνωση της νόσου. Η πρωτεομική τεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα για τον ΚΠΕ [248]. Πειραματικά μοντέλα, όπως καρκινικές κυτταρικές σειρές που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια της νόσου και πειραματόζωα που αναπτύσσουν καρκίνο μετά από γενετικό χειρισμό [249] ή έκθεση σε χημικές ουσίες [250], έχουν αποτελέσει πρώτη ύλη για την εφαρμογή πρωτεομικών τεχνολογιών. Τα μοντέλα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη διερεύνηση των μονοπατιών καρκινογένεσης [251] και τη διαλεύκανση των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε φάρμακα [252], [253], [254], [255]. Επιπλέον, βιολογικά δείγματα όπως αίμα και ούρα ασθενών με ΚΠΕ έχουν αναλυθεί με πρωτεομική τεχνολογία στην αναζήτηση δεικτών για τη διάγνωση του ΚΠΕ [256], [257], [258]. Η πρωτεομική ανάλυση υγιούς vs καρκινικού ιστού από τον ίδιο ασθενή έχει δώσει πληροφορίες για σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης πολλών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια σχηματισμού του όγκου [259].

Συγκριτική ανάλυση διαφόρων πρωτεομικών μελετών οδηγεί στην ανάδειξη πρωτεϊνών, το προφίλ έκφρασης των οποίων αλλάζει είτε κατά τη μετάβαση από τη φυσιολογική κατάσταση στη νεοπλασματική είτε από ένα στάδιο σε επόμενο. Οι μελέτες αυτές αφορούν είτε καρκινικές σειρές του ΚΠΕ είτε ζεύγη δειγμάτων ασθενών (υγιής και καρκινικός ιστός). Στον **πίνακα Π2** παρατίθεται μια επιλογή από αυτές τις πρωτεΐνες και ο τρόπος αλλαγής της έκφρασής τους, συνδυάζοντας τις προαναφερθείσες πρωτεομικές μελέτες με την παρούσα. Κάποιες πρωτεΐνες, όπως η 14-3-3 ζ/δ και η annexin A1, φαίνεται να ρυθμίζονται θετικά τόσο σε άλλες όσο και σε αυτή τη μελέτη, γεγονός που αποδίδει στις πρωτεΐνες αυτές έναν γενικότερο ρόλο στον ΚΠΕ. Η έκφραση της gelsolin και της vimentin από την άλλη μεριά, δείχνει αναντιστοιχίες, κάτι που μπορεί να υποδεικνύει ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών μεταβάλλονται μεταξύ των διαφόρων σταδίων και πιθανόν τα αυξημένα επίπεδα να σχετίζονται άμεσα με τη μεταλλαγμένη μορφή της KRAS. Η συσχέτιση πρωτεϊνών με συγκεκριμένο στάδιο του ΚΠΕ ή με την εμφάνιση μετάλλαξης σε κάποιο ογκογονίδιο

είναι πολύ σημαντική για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών ως δείκτες της νόσου ή τη στόχευσή τους για τη θεραπεία της.

Όνομα πρωτεΐνης	SWISS PROT	Αλλαγή έκφρασης σε άλλες πρωτεομικές μελέτες	Αλλαγή έκφρασης στην παρούσα μελέτη
14-3-3 ζ/δ	P63104	UP [260], [261]	UP (COMMON)
Adenosylhomocysteinase	P23526	UP [261], [262]	DOWN (COMMON)
Annexin A1	P04083	UP [261], [263]	UP (COMMON)
Annexin A3	P12429	UP [261], [262]	DOWN (HRAS <sup>V12</sup> )
Annexin A5	P08758	UP [260], [261], [264], [265], [266]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
Calreticulin	P27797	DOWN [264]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
Creatine kinase B-type	P12277	DOWN [261], [267]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
GAPDH	P04406	UP [262], [268], [269], [270]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
Gelsolin	P06396	DOWN [262], [270]	UP (COMMON)
Glutathione S-transferase P	P09211	UP [261], [266]	DOWN (COMMON)
Heat shock protein beta-1	P04792	UP [266], [269]	UP (COMMON)
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	P52597	UP [260], [267], [271]	DOWN (HRAS <sup>V12</sup> )
High mobility group protein B1	P09429	UP [272], [267]	UP (HRAS <sup>V12</sup> )
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	UP [260], [261]	DOWN (HRAS <sup>V12</sup> )
Lamin B1	P20700	UP [265], [270], [271]	UP (COMMON)
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q15691	UP [260], [261]	DOWN (COMMON)
Nicotinamide N-methyltransferase	P40261	UP [260], [271]	UP (COMMON)
Nucleoside diphosphatase kinase A	P15531	UP [261], [262], [269]	DOWN (HRAS <sup>V12</sup> )
Retinal dehydrogenase 1	P00352	DOWN [261], [272]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	UP [261], [266]	UP (COMMON)
Serpin B1 (Leukocyte elastase inhibitor)	P30740	UP [260], [261]	DOWN (COMMON)
Transketolase	P29401	UP [271]	DOWN (KRAS <sup>V12</sup> )
Villin 1	P09327	DOWN [262], [271]	DOWN (COMMON)
Vimentin	P08670	DOWN [260], [261], [263], [264], [273]	UP (COMMON)

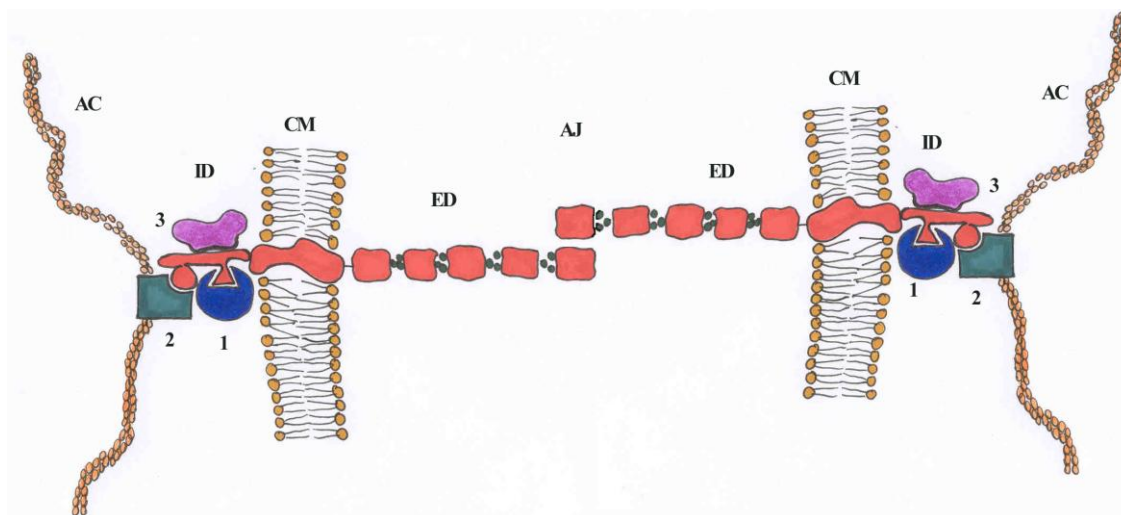
**Πίνακας Π2:** Πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση παρατηρήθηκε να αλλάζει σε τουλάχιστον μία πρωτεομική μελέτη σχετική με τον ΚΠΕ. Στη δεύτερη στήλη αναφέρεται ο αριθμός καταχώρισής τους στη βάση δεδομένων SWISS PROT. Στην τρίτη στήλη, αναφέρεται ο τρόπος ρύθμισής τους (UP: θετική ρύθμιση, DOWN: αρνητική ρύθμιση) και παρατίθενται οι μελέτες που τις ταυτοποίησαν, ενώ στην τέταρτη στήλη, ο τρόπος ρύθμισής τους από τα ογκογονίδια RAS στην παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, με τη χρήση των πρωτεομικών τεχνολογιών έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για την διερεύνηση του ρόλου των ογκογονιδίων *RAS* στο μετασχηματισμό κυττάρων, όπως είναι οι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (NIH3T3) [274], [275], [276] και τα επιθηλιακά κύτταρα νεφρού από σκύλο (MDCK) [277], [245]. Ταυτόχρονα, η ανάλυση του πρωτεομικού προφίλ κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου που φέρουν ήδη μεταλλάξεις στο *KRAS<sup>D13</sup>*, όπως η DLD1 και η HCT116, προσπάθησαν να δώσουν απαντήσεις για το ρόλο και τους μηχανισμούς καρκινογένεσης που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο καθώς και για τις διαφορές μεταξύ των μελών της οικογένειας *RAS* [278]. Το γενετικό υπόβαθρο της εκάστοτε κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ογκογονιδίων οδηγεί το μετασχηματισμό προς διαφορετική, κάθε φορά, κατεύθυνση. Αυτό σημαίνει ότι οι αλλαγές που προκαλεί το ογκογονίδιο *KRAS* στο πρωτεομικό προφίλ μιας κυτταρικής σειράς δεν είναι οι ίδιες σε κάθε άλλη σειρά και η ρύθμιση των πρωτεϊνών δεν είναι πάντα παρόμοια. Για παράδειγμα, στο κυτταρικό μοντέλο της παρούσας μελέτης, και τα δύο ογκογονίδια *RAS* προκαλούν θετική ρύθμιση της vimentin, όταν τα ογκογονίδια αυτά όμως εκφραστούν σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού η έκφραση της vimentin δεν επηρεάζεται [274]. Τα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τα μέλη της οικογένειας *RAS* σε συνδυασμό με τον διαφορετικό εντοπισμό τους μέσα στο κύτταρο διατηρούν αναπάντητα πολλά ερωτήματα σχετικά με το ρόλο τους στην καρκινογένεση.

Η παρατήρηση ότι τα δύο ογκογονίδια ρυθμίζουν με τον ίδιο τρόπο την έκφραση κοινών πρωτεϊνών έδωσε την ιδέα ότι μπορεί το ένα ογκογονίδιο να ενεργοποιεί ή να σταθεροποιεί το προϊόν του άλλου. Συγκεκριμένα, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι το *KRAS<sup>V12</sup>* μπορεί να λειτουργεί, εν μέρει, μέσω της ενεργοποίησης της ενδογενούς αγρίου τύπου *HRAS* στα κύτταρα που έχει μετασχηματίσει (Caco2-*KRAS<sup>V12</sup>*). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *HRAS*, καθώς και τα επίπεδα του mRNA της, βρέθηκαν αυξημένα στα Caco2-*KRAS<sup>V12</sup>* κύτταρα. Τα υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα αντιστοιχούσαν και σε αυξημένη ενεργότητα GTPάσης της *HRAS*. Σε πρόσφατη μελέτη [237], έχει προταθεί η πιθανή εμπλοκή της *HRAS* στη σηματοδότηση της ογκογόνου *KRAS*. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η ενδογενής *HRAS* σε κύτταρα που εκφράζουν την ογκογόνο *KRAS* (HCT116) συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων από την ακτινοβολία, χωρίς να έχει δοθεί εξήγηση για την άμεση σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης της *HRAS* και της παρουσίας της ογκογόνου *KRAS*. Το

μέγεθος της εμπλοκής της ενδογενούς HRAS στις πρωτεομικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών gelsolin, fascin 1 και vimentin, ενώ τα επίπεδα της villin 1 δεν αυξήθηκαν. Υπάρχουν 35 ακόμη πρωτεΐνες που ρυθμίζονται με κοινό τρόπο από τα δύο ογκογονίδια. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να εξακριβωθεί ποιες από αυτές τις αλλαγές εξαρτώνται από την HRAS και ποιες οφείλονται απλά στην ενεργοποίηση κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών από τα δύο ογκογονίδια. Παρόλες τις διαφορές τους, οι RAS πρωτεΐνες είναι GTPάσες με παρόμοια δομή και αλληλεπιδρούν με κοινά μόρια-τελεστές. Δεν θα ήταν λοιπόν παράξενο αν πολλές από τις πρωτεομικές αλλαγές που προκαλούν είναι ίδιες. Στην περίπτωση αυτή, η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού και μόνο αυτή είναι ικανή να επαναφέρει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μεταβάλλονται. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση των αναστολέων του μονοπατιού των MAP κινασών κατέδειξε το ρόλο του μονοπατιού στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών, καθοδικά της ενεργοποίησης της HRAS. Το μονοπάτι αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει «ενοχοποιηθεί» για πολλές από τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως η αλλαγή της μορφολογίας, η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και ο έντονος ρυθμός πολλαπλασιασμού [279].

Η θετική ρύθμιση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών gelsolin, fascin 1 και vimentin, οι οποίες ελέγχουν τον πολυμερισμό της ακτίνης έτσι ώστε να αλλάζει η μορφολογία του κυττάρου και η κινητικότητά του, οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση των μεταστατικών ιδιοτήτων των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων. Προκειμένου τα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν μεταστατική και διεισδυτική δυναμική, πρέπει να χάσουν τον επιθηλιακό τους χαρακτήρα και συνεπώς να διακοπούν οι επαφές μεταξύ των κυττάρων. Ο επιθηλιακός χαρακτήρας φαίνεται να εκλείπει με τη μείωση της έκφρασης της villin 1, χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Ταυτόχρονα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της επιθηλιακής καντερίνης (E-cadherin), η οποία ομοδιμερίζεται και φέρνει σε επαφή γειτονικά κύτταρα ενώ είναι προσκολλημένη με τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού (**εικόνα Σ2**) [4].



**Εικόνα Σ2:** Σχηματική απεικόνιση της επιθηλιακής καντερίνης στις διακυτταρικές συνδέσεις (*adherens junctions*). Φαίνεται ο ομοδιμερισμός της επιθηλιακής καντερίνης στις κυτταρικές μεμβράνες γειτονικών κυττάρων [4].

AJ: διακυτταρικές συνδέσεις, CM: κυτταροπλασματική μεμβράνη, ED: εξωκυττάρια περιοχή, ID: ενδοκυττάρια περιοχή, AC: κυτταροσκελετός ακτίνης, 1. β-κατενίνη, 2. α-κατενίνη, 3. p120

Τα RAS-μετασχηματισμένα κύτταρα παρουσίασαν πολύ χαμηλά επίπεδα επιθηλιακής καντερίνης. Η αρνητική ρύθμισή της σχετίζεται με ελάττωση των διακυτταρικών συνδέσεων, με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρική κινητικότητα και μεταστατικές ιδιότητες [280]. Ανοσοφθορισμός με μικροσκοπία συνεστιακής απεικόνισης έδειξε όχι μόνο μειωμένα επίπεδα επιθηλιακής καντερίνης αλλά και απουσία της από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και τα σημεία επαφής των κυττάρων. Η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων και μερική αποκατάσταση του εντοπισμού της στο κύτταρο και τις διακυτταρικές επαφές. Η αύξηση των επιπέδων της, ωστόσο, δεν απεκατέστησε πλήρως την κατανομή της. Το γεγονός αυτό ίσως δικαιολογεί την ύπαρξη ενός ποσοστού RAS-μετασχηματισμένων κυττάρων που διατηρούν τις μεταστατικές τους ικανότητες, αποικοδομούν το Matrigel και διαπερνούν τους πόρους της μεμβράνης (*in vitro* δοκιμασία κυτταρικής διείσδυσης). Παρόλο που τα αποτελέσματα της παρούσας μέλετης προτείνουν τη δυνατότητα της HRAS να ρυθμίζει τις διεισδυτικές ικανότητες των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων, είναι αναμενόμενο ότι περαιτέρω αλλαγές, που έχουν συμβεί κατά τον μετασχηματισμό σε αυτά τα κύτταρα, μπορούν να επηρεάσουν τις μεταστατικές τους ιδιότητες. Κατ' αντιστοιχία, η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS στα Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κύτταρα δεν είναι επαρκής για να εμποδίσει ολοκληρωτικά την

μεταναστευτική τους δυναμική. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί επίσης με την εναπομείνασα ενεργότητα της εξωγενούς μεταλλαγμένης HRAS<sup>V12</sup>. Επιπλέον, η ενεργοποίηση από την HRAS σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν την κυτταρική κινητικότητα μπορεί να μην έχει αναστραφεί αποτελεσματικά για το χρονικό διάστημα του πειράματος. Παρόλα αυτά, η μεταστατική δυναμική τόσο των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> όσο και των Caco2-HRAS<sup>V12</sup> κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά μετά τη γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS, υποδηλώνοντας έναν ενεργό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία.

Η συγκριτική ανάλυση του μετασχηματισμού των Caco2 κυττάρων από τα δύο ογκογονίδια KRAS<sup>V12</sup> και HRAS<sup>V12</sup> θα μπορούσε να δώσει απαντήσεις στο ερώτημα γιατί στον ΚΠΕ απαντώνται τόσο συχνά μεταλλάξεις στο KRAS και όχι στο HRAS. Έχει προταθεί ότι οι συνεχώς ενεργές ισομορφές των RAS μπορούν να προάγουν με διαφορετικό τρόπο τα πρόδρομα κύτταρα του ενδοδέρματος και ότι η μεταλλαγμένη KRAS μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου πληθυσμού βλαστικών κυττάρων και έτσι να συμβάλλει στην καρκινογένεση [281]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι πράγματι η HRAS μπορεί να έχει πιο ενεργό ρόλο στον κυτταρικό μετασχηματισμό που επάγει το ογκογονίδιο KRAS<sup>V12</sup>. Το γεγονός αυτό επαληθεύεται από τη μικρή αλλά επαναλήψιμη μείωση της μεταστατικής ικανότητας των Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κυττάρων μετά τη γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι, παρόλο που δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο HRAS στον ΚΠΕ, η ενδογενής HRAS πρωτεΐνη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, με το να ενισχύει μερικές επιδράσεις του συνεχώς ενεργού, μεταλλαγμένου KRAS. Το 2001 δημοσιεύθηκε μία μελέτη, που ανέλυε τα επίπεδα της HRAS σε ιστολογικά δείγματα ασθενών με ΚΠΕ, χωρίς να εξετάζει αν το KRAS ήταν μεταλλαγμένο, και ανέφερε άμεση συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων HRAS και της μετάστασης [282]. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι το 2000 ολοκληρώθηκε η φάση II κλινικών δοκιμών του φαρμάκου ISIS 2503 σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ. Το συγκεκριμένο φάρμακο αποτελείται από ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν το mRNA της HRAS και εμποδίζουν την έκφρασή της. Περαιτέρω διερεύνηση της συσχέτισης της ογκογόνου KRAS και της ενδογενούς HRAS σε δείγματα ασθενών θα βοηθήσει



---

στην κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και κατ'επέκταση στον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ  
ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ  
ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* είναι από τις πιο συχνές γενετικές μεταβολές που παρατηρούνται στην ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου. Ειδικότερα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, το ογκογονίδιο *KRAS* μεταλλάσσεται στα αρχικά στάδια της νόσου και αφού έχουν προηγηθεί μεταλλάξεις και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το *APC*. Οι *RAS* πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των μικρών GTPασών και εναλλάσσονται μεταξύ μιας ανενεργής (που προσδένει το GDP) και μιας ενεργής (που προσδένει το GTP) μορφής. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου οδηγούν συνήθως σε πρωτεΐνη που βρίσκεται συνεχώς στην ενεργή μορφή και ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Στην παρούσα μελέτη, αναζητήθηκαν οι αλλαγές που προκαλούν τα ογκογονίδια *KRAS*<sup>V12</sup> και *HRAS*<sup>V12</sup> στο πρωτεομικό προφίλ της Caco2, μιας κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου που δεν φέρει μεταλλάξεις στους γενετικούς τόπους των *RAS*. Η έκφραση των δύο ογκογονιδίων οδήγησε στη δημιουργία δύο νέων κυτταρικών σειρών, Caco2-*KRAS*<sup>V12</sup> και Caco2-*HRAS*<sup>V12</sup>. Η σύγκριση των πρωτεομικών προφίλ των τριών κυτταρικών σειρών έγινε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν περίπου 200 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες με διαδοχική φασματομετρία μάζας. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες αυτές ήταν μοναδικές για κάθε ογκογονίδιο. Υπήρξε όμως και σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών ρυθμιζόμενων με κοινό τρόπο από τα δύο ογκογονίδια.

Στα Caco2-*KRAS*<sup>V12</sup> κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι ο μετασχηματισμός από το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>V12</sup> οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων και της ενεργότητας της ενδογενούς *HRAS* πρωτεΐνης. Η γονιδιακή αποσιώπηση της τελευταίας προκάλεσε αναστροφή των πρωτεομικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν στα Caco2-*KRAS*<sup>V12</sup> κύτταρα. Η διαπίστωση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι η μεταλλαγμένη και συνεχώς ενεργή *KRAS* λειτουργεί, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της ενεργοποίησης της

ενδογενούς HRAS. Με χρήση χημικών αναστολέων, δείχτηκε επιπλέον ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών παίζει καθοριστικό ρόλο καθοδικά της ανωτέρω διαδικασίας. Τέλος, δείχτηκε ότι η γονιδιακή αποσιώπηση της HRAS στα Caco2-KRAS<sup>V12</sup> κύτταρα επαναφέρει την έκφραση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και συσχετίζεται με τον περιορισμό των μεταστατικών ιδιοτήτων των κυττάρων αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν μια πιθανή συνέργια της ογκογόνου KRAS και της ενδογενούς HRAS στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου.

***SUMMARY***

---

**PROTEOMIC ANALYSIS OF A COLORECTAL CANCER CELL MODEL****DOCTORATE THESIS BY****GEORGIA IKONOMOU**

Mutation of *RAS* genes is one of the most common genetic alterations contributing to cancer development. For colorectal cancer in particular, activating *RAS* mutations are very common and contribute in the progression of adenoma to carcinoma. *KRAS* is mutated at early stages, after mutations in tumor suppressor genes, such as *APC*, have occurred. *RAS* proteins are members of the family of small GTPases and cycle between an inactive, GDP-bound and an active, GTP-bound conformation. Mutations of these genes generate constitutively active proteins that stimulate signaling pathways regulating diverse cellular processes, such as proliferation, apoptosis, motility, etc.

In this study, we sought to identify changes in the proteome of the Caco2 colon adenocarcinoma cell line induced by the expression of two distinct *RAS* oncogenes, *Kirsten-* and *Harvey-RAS*, in their mutated, constitutively active forms (*KRAS*<sup>V12</sup> and *HRAS*<sup>V12</sup> respectively). Protein extracts from two pairs of samples, Caco2 vs Caco2-*KRAS*<sup>V12</sup> and Caco2 vs Caco2-*HRAS*<sup>V12</sup> were subjected to two dimensional electrophoresis. Approximately 200 differentially expressed proteins were identified by LC-MS/MS. While many of them were unique to each expressed oncogene, there were also substantial similarities. Interestingly, transformation by mutant *KRAS*<sup>V12</sup> resulted in elevated expression levels and activity of endogenous, wild type *HRAS*. Silencing the latter with a specific siRNA reversed several proteomic changes observed in *KRAS*<sup>V12</sup>-transformed cells, suggesting that oncogenic *KRAS* partly exerts its effects through endogenous *HRAS* activation. The involvement of the MAPK pathway downstream of *HRAS* activation was confirmed with the use of specific pathway inhibitors. Finally, *HRAS* siRNA reversed the *KRAS*<sup>V12</sup>-induced changes in the expression of cytoskeletal and cell adhesion proteins and resulted in a reduction of the invasive potential of transformed cells. Our data reveal a novel interplay between *KRAS* and *HRAS* with interesting implications for colorectal carcinogenesis.

***BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

- 
- [1] Schubbert, S., K. Shannon and G. Bollag. "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." *Nat Rev Cancer*, (2007) **7**(4): 295-308.
- [2] Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg. "Ras oncogenes: split personalities." *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2008) **9**(7): 517-531.
- [3] Lowy, D. R. and B. M. Willumsen. "Protein modification: new clue to Ras lipid glue." *Nature*, (1989) **341**(6241): 384-385.
- [4] Pecina-Slaus, N. "Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells." *Cancer Cell Int*, (2003) **3**(1): 17.
- [5] Fearon, E. R. and B. Vogelstein. "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell*, (1990) **61**(5): 759-767.
- [6] Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli. "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2009) **361**(25): 2449-2460.
- [7] Bamford, S., E. Dawson, S. Forbes, J. Clements, R. Pettett, A. Dogan, A. Flanagan, J. Teague, P. A. Futreal, M. R. Stratton and R. Wooster. "The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website." *Br J Cancer*, (2004) **91**(2): 355-358.
- [8] Pinto, D., A. Gregorieff, H. Begthel and H. Clevers. "Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium." *Genes Dev*, (2003) **17**(14): 1709-1713.
- [9] Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward. "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin*, (2010) **60**(5): 277-300.
- [10] Endo, Y., H. Sugimura and I. Kino. "Monoclonality of normal human colonic crypts." *Pathol Int*, (1995) **45**(8): 602-604.
- [11] Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature*, (1997) **386**(6625): 623-627.
- [12] Barber, T. D., K. McManus, K. W. Yuen, M. Reis, G. Parmigiani, D. Shen, I. Barrett, Y. Nouhi, F. Spencer, S. Markowitz, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer and P. Hieter. "Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2008) **105**(9): 3443-3448.
- [13] Leary, R. J., J. C. Lin, J. Cummins, S. Boca, L. D. Wood, D. W. Parsons, S. Jones, T. Sjoblom, B. H. Park, R. Parsons, J. Willis, D. Dawson, J. K. Willson, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, L. Kopelovich, N. Papadopoulos, L. A. Pennacchio, T. L. Wang, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E.



Velculescu. "Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2008) **105**(42): 16224-16229.

[14] Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata and M. Perucho. "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." *Nature*, (1993) **363**(6429): 558-561.

[15] Issa, J. P. "CpG island methylator phenotype in cancer." *Nat Rev Cancer*, (2004) **4**(12): 988-993.

[16] Kondo, Y. and J. P. Issa. "Epigenetic changes in colorectal cancer." *Cancer Metastasis Rev*, (2004) **23**(1-2): 29-39.

[17] Goss, K. H. and J. Groden. "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." *J Clin Oncol*, (2000) **18**(9): 1967-1979.

[18] Lynch, H. T., J. F. Lynch, P. M. Lynch and T. Attard. "Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management." *Fam Cancer*, (2008) **7**(1): 27-39.

[19] Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers. "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma." *Science*, (1997) **275**(5307): 1784-1787.

[20] Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler. "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science*, (1997) **275**(5307): 1787-1790.

[21] Baker, S. J., E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, P. vanTuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, R. White and B. Vogelstein. "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science*, (1989) **244**(4901): 217-221.

[22] Baker, S. J., S. Markowitz, E. R. Fearon, J. K. Willson and B. Vogelstein. "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science*, (1990) **249**(4971): 912-915.

[23] Baker, S. J., A. C. Preisinger, J. M. Jessup, C. Paraskeva, S. Markowitz, J. K. Willson, S. Hamilton and B. Vogelstein. "p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis." *Cancer Res*, (1990) **50**(23): 7717-7722.

- [24] Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and et al. "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." *Science*, (1995) **268**(5215): 1336-1338.
- [25] Grady, W. M., L. L. Myeroff, S. E. Swinler, A. Rajput, S. Thiagalingam, J. D. Lutterbaugh, A. Neumann, M. G. Brattain, J. Chang, S. J. Kim, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, J. K. Willson and S. Markowitz. "Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers." *Cancer Res*, (1999) **59**(2): 320-324.
- [26] Sjoblom, T., S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler and V. E. Velculescu. "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers." *Science*, (2006) **314**(5797): 268-274.
- [27] Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu and B. Vogelstein. "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science*, (2007) **318**(5853): 1108-1113.
- [28] Grady, W. M., A. Rajput, L. Myeroff, D. F. Liu, K. Kwon, J. Willis and S. Markowitz. "Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas." *Cancer Res*, (1998) **58**(14): 3101-3104.
- [29] Noshu, K., N. Irahara, K. Shima, S. Kure, G. J. Kirkner, E. S. Schernhammer, A. Hazra, D. J. Hunter, J. Quackenbush, D. Spiegelman, E. L. Giovannucci, C. S. Fuchs and S. Ogino. "Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample." *PLoS One*, (2008) **3**(11): e3698.

- [30] Bos, J. L., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J. H. van Boom, A. J. van der Eb and B. Vogelstein. "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers." *Nature*, (1987) **327**(6120): 293-297.
- [31] Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal. "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature*, (2002) **417**(6892): 949-954.
- [32] Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu. "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." *Nature*, (2002) **418**(6901): 934.
- [33] Siena, S., A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, J. Balfour and A. Bardelli. "Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer." *J Natl Cancer Inst*, (2009) **101**(19): 1308-1324.
- [34] Shen, L., M. Toyota, Y. Kondo, E. Lin, L. Zhang, Y. Guo, N. S. Hernandez, X. Chen, S. Ahmed, K. Konishi, S. R. Hamilton and J. P. Issa. "Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2007) **104**(47): 18654-18659.
- [35] Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile and P. W. Laird. "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer." *Nat Genet*, (2006) **38**(7): 787-793.
- [36] O'Brien, M. J. "Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum." *Gastroenterol Clin North Am*, (2007) **36**(4): 947-968, viii.
- [37] Jass, J. R. "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." *Histopathology*, (2007) **50**(1): 113-130.

- [38] Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu. "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." *Science*, (2004) **304**(5670): 554.
- [39] Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler. "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." *Science*, (2008) **321**(5897): 1807-1812.
- [40] Saltz, L. B., N. J. Meropol, P. J. Loehrer, Sr., M. N. Needle, J. Kopit and R. J. Mayer. "Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor." *J Clin Oncol*, (2004) **22**(7): 1201-1208.
- [41] Cunningham, D., Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau and E. Van Cutsem. "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2004) **351**(4): 337-345.
- [42] Meyerhardt, J. A. and R. J. Mayer. "Systemic therapy for colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2005) **352**(5): 476-487.
- [43] Van Cutsem, E., M. Peeters, S. Siena, Y. Humblet, A. Hendlisz, B. Neyns, J. L. Canon, J. L. Van Laethem, J. Maurel, G. Richardson, M. Wolf and R. G. Amado. "Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol*, (2007) **25**(13): 1658-1664.
- [44] Amado, R. G., M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, T. Juan, R. Sikorski, S. Suggs, R. Radinsky, S. D. Patterson and D. D. Chang. "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol*, (2008) **26**(10): 1626-1634.
- [45] Lievre, A., B. Landi, E. Mitry and J. Taieb. "[Antiangiogenic agents and gastrointestinal cancers]." *Gastroenterol Clin Biol*, (2008) **32**(5 Pt 1): 504-520.
- [46] Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, D. Tu, N. C. Tebbutt, R. J. Simes, H. Chalchal, J. D. Shapiro, S. Robitaille, T. J. Price, L.

Shepherd, H. J. Au, C. Langer, M. J. Moore and J. R. Zalcberg. "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2008) **359**(17): 1757-1765.

[47] Di Nicolantonio, F., M. Martini, F. Molinari, A. Sartore-Bianchi, S. Arena, P. Saletti, S. De Dosso, L. Mazzucchelli, M. Frattini, S. Siena and A. Bardelli. "Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol*, (2008) **26**(35): 5705-5712.

[48] Wong, R. and D. Cunningham. "Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies." *J Clin Oncol*, (2008) **26**(35): 5668-5670.

[49] Jhaver, M., S. Goel, A. J. Wilson, C. Montagna, Y. H. Ling, D. S. Byun, S. Nasser, D. Arango, J. Shin, L. Klampfer, L. H. Augenlicht, R. Perez-Soler and J. M. Mariadason. "PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab." *Cancer Res*, (2008) **68**(6): 1953-1961.

[50] Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross and F. Kabbinavar. "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2004) **350**(23): 2335-2342.

[51] Markowitz, S. D. "Aspirin and colon cancer--targeting prevention?" *N Engl J Med*, (2007) **356**(21): 2195-2198.

[52] Cha, Y. I. and R. N. DuBois. "NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2." *Annu Rev Med*, (2007) **58**: 239-252.

[53] Yan, M., R. M. Rerko, P. Platzer, D. Dawson, J. Willis, M. Tong, E. Lawrence, J. Lutterbaugh, S. Lu, J. K. Willson, G. Luo, J. Hensold, H. H. Tai, K. Wilson and S. D. Markowitz. "15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004) **101**(50): 17468-17473.

[54] Myung, S. J., R. M. Rerko, M. Yan, P. Platzer, K. Guda, A. Dotson, E. Lawrence, A. J. Dannenberg, A. K. Lovgren, G. Luo, T. P. Pretlow, R. A. Newman, J. Willis, D. Dawson and S. D. Markowitz. "15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2006) **103**(32): 12098-12102.

- [55] Backlund, M. G., J. R. Mann, V. R. Holla, F. G. Buchanan, H. H. Tai, E. S. Musiek, G. L. Milne, S. Katkuri and R. N. DuBois. "15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer." *J Biol Chem*, (2005) **280**(5): 3217-3223.
- [56] Chan, A. T., S. Ogino and C. S. Fuchs. "Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2." *N Engl J Med*, (2007) **356**(21): 2131-2142.
- [57] Baron, J. A., B. F. Cole, R. S. Sandler, R. W. Haile, D. Ahnen, R. Bresalier, G. McKeown-Eyssen, R. W. Summers, R. Rothstein, C. A. Burke, D. C. Snover, T. R. Church, J. I. Allen, M. Beach, G. J. Beck, J. H. Bond, T. Byers, E. R. Greenberg, J. S. Mandel, N. Marcon, L. A. Mott, L. Pearson, F. Saibil and R. U. van Stolk. "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas." *N Engl J Med*, (2003) **348**(10): 891-899.
- [58] Sandler, R. S., S. Halabi, J. A. Baron, S. Budinger, E. Paskett, R. Keresztes, N. Petrelli, J. M. Pipas, D. D. Karp, C. L. Loprinzi, G. Steinbach and R. Schilsky. "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer." *N Engl J Med*, (2003) **348**(10): 883-890.
- [59] Bertagnolli, M. M., C. J. Eagle, A. G. Zauber, M. Redston, S. D. Solomon, K. Kim, J. Tang, R. B. Rosenstein, J. Wittes, D. Corle, T. M. Hess, G. M. Woloj, F. Boisserie, W. F. Anderson, J. L. Viner, D. Bagheri, J. Burn, D. C. Chung, T. Dewar, T. R. Foley, N. Hoffman, F. Macrae, R. E. Pruitt, J. R. Saltzman, B. Salzberg, T. Sylwestrowicz, G. B. Gordon and E. T. Hawk. "Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas." *N Engl J Med*, (2006) **355**(9): 873-884.
- [60] Arber, N., C. J. Eagle, J. Spicak, I. Racz, P. Dite, J. Hajer, M. Zavoral, M. J. Lechuga, P. Gerletti, J. Tang, R. B. Rosenstein, K. Macdonald, P. Bhadra, R. Fowler, J. Wittes, A. G. Zauber, S. D. Solomon and B. Levin. "Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps." *N Engl J Med*, (2006) **355**(9): 885-895.
- [61] Steinbach, G., P. M. Lynch, R. K. Phillips, M. H. Wallace, E. Hawk, G. B. Gordon, N. Wakabayashi, B. Saunders, Y. Shen, T. Fujimura, L. K. Su and B. Levin. "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." *N Engl J Med*, (2000) **342**(26): 1946-1952.
- [62] DeFeo, D., M. A. Gonda, H. A. Young, E. H. Chang, D. R. Lowy, E. M. Scolnick and R. W. Ellis. "Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1981) **78**(6): 3328-3332.

- [63] Ellis, R. W., D. DeFeo, M. E. Furth and E. M. Scolnick. "Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein." *Mol Cell Biol*, (1982) **2**(11): 1339-1345.
- [64] Chang, E. H., M. A. Gonda, R. W. Ellis, E. M. Scolnick and D. R. Lowy. "Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1982) **79**(16): 4848-4852.
- [65] Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." *Nature*, (1976) **260**(5547): 170-173.
- [66] Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg. "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene." *Nature*, (1982) **297**(5866): 474-478.
- [67] Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1982) **79**(11): 3637-3640.
- [68] Santos, E., S. R. Tronick, S. A. Aaronson, S. Pulciani and M. Barbacid. "T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes." *Nature*, (1982) **298**(5872): 343-347.
- [69] Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. "Mechanism of activation of a human oncogene." *Nature*, (1982) **300**(5888): 143-149.
- [70] Reddy, E. P., R. K. Reynolds, E. Santos and M. Barbacid. "A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene." *Nature*, (1982) **300**(5888): 149-152.
- [71] Taparowsky, E., Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb and M. Wigler. "Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change." *Nature*, (1982) **300**(5894): 762-765.
- [72] Capon, D. J., E. Y. Chen, A. D. Levinson, P. H. Seeburg and D. V. Goeddel. "Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue." *Nature*, (1983) **302**(5903): 33-37.

- [73] Clark, R., G. Wong, N. Arnheim, D. Nitecki and F. McCormick. "Antibodies specific for amino acid 12 of the ras oncogene product inhibit GTP binding." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1985) **82**(16): 5280-5284.
- [74] Der, C. J., T. Finkel and G. M. Cooper. "Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61." *Cell*, (1986) **44**(1): 167-176.
- [75] Shimizu, K., M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh and M. H. Wigler. "Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1983) **80**(8): 2112-2116.
- [76] Hall, A., C. J. Marshall, N. K. Spurr and R. A. Weiss. "Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1." *Nature*, (1983) **303**(5916): 396-400.
- [77] Taparowsky, E., K. Shimizu, M. Goldfarb and M. Wigler. "Structure and activation of the human N-ras gene." *Cell*, (1983) **34**(2): 581-586.
- [78] Murray, M. J., J. M. Cunningham, L. F. Parada, F. Dautry, P. Lebowitz and R. A. Weinberg. "The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors." *Cell*, (1983) **33**(3): 749-757.
- [79] Newbold, R. F. and R. W. Overell. "Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene." *Nature*, (1983) **304**(5927): 648-651.
- [80] Land, H., L. F. Parada and R. A. Weinberg. "Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes." *Nature*, (1983) **304**(5927): 596-602.
- [81] Ruley, H. E. "Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture." *Nature*, (1983) **304**(5927): 602-606.
- [82] Rhim, J. S., G. Jay, P. Arnstein, F. M. Price, K. K. Sanford and S. A. Aaronson. "Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses." *Science*, (1985) **227**(4691): 1250-1252.
- [83] Yoakum, G. H., J. F. Lechner, E. W. Gabrielson, B. E. Korba, L. Malan-Shibley, J. C. Willey, M. G. Valerio, A. M. Shamsuddin, B. F. Trump and C. C. Harris. "Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene." *Science*, (1985) **227**(4691): 1174-1179.
- [84] Yancopoulos, G. D., P. D. Nisen, A. Tesfaye, N. E. Kohl, M. P. Goldfarb and F. W. Alt. "N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1985) **82**(16): 5455-5459.



- [85] Santos, E., D. Martin-Zanca, E. P. Reddy, M. A. Pierotti, G. Della Porta and M. Barbacid. "Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient." *Science*, (1984) **223**(4637): 661-664.
- [86] Nakano, H., F. Yamamoto, C. Neville, D. Evans, T. Mizuno and M. Perucho. "Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1984) **81**(1): 71-75.
- [87] Hirai, H., T. Okabe, Y. Anraku, M. Fujisawa, A. Urabe and F. Takaku. "Activation of the c-K-ras oncogene in a human pancreas carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun*, (1985) **127**(1): 168-174.
- [88] Hand, P. H., A. Thor, D. Wunderlich, R. Muraro, A. Caruso and J. Schlom. "Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1984) **81**(16): 5227-5231.
- [89] Fujita, J., O. Yoshida, Y. Yuasa, J. S. Rhim, M. Hatanaka and S. A. Aaronson. "Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours." *Nature*, (1984) **309**(5967): 464-466.
- [90] Gambke, C., E. Signer and C. Moroni. "Activation of N-ras gene in bone marrow cells from a patient with acute myeloblastic leukaemia." *Nature*, (1984) **307**(5950): 476-478.
- [91] Gambke, C., A. Hall and C. Moroni. "Activation of an N-ras gene in acute myeloblastic leukemia through somatic mutation in the first exon." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1985) **82**(3): 879-882.
- [92] Bos, J. L., D. Toksoz, C. J. Marshall, M. Verlaan-de Vries, G. H. Veeneman, A. J. van der Eb, J. H. van Boom, J. W. Janssen and A. C. Steenvoorden. "Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia." *Nature*, (1985) **315**(6022): 726-730.
- [93] Janssen, J. W., A. C. Steenvoorden, J. G. Collard and R. Nusse. "Oncogene activation in human myeloid leukemia." *Cancer Res*, (1985) **45**(7): 3262-3267.
- [94] Sklar, M. D. and G. R. Kitchingman. "Isolation of activated ras transforming genes from two patients with Hodgkin's disease." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, (1985) **11**(1): 49-55.
- [95] Padua, R. A., N. C. Barrass and G. A. Currie. "Activation of N-ras in a human melanoma cell line." *Mol Cell Biol*, (1985) **5**(3): 582-585.

- [96] Sukumar, S., V. Notario, D. Martin-Zanca and M. Barbacid. "Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations." *Nature*, (1983) **306**(5944): 658-661.
- [97] Balmain, A. and I. B. Pragnell. "Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene." *Nature*, (1983) **303**(5912): 72-74.
- [98] Balmain, A., M. Ramsden, G. T. Bowden and J. Smith. "Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas." *Nature*, (1984) **307**(5952): 658-660.
- [99] Guerrero, I., P. Calzada, A. Mayer and A. Pellicer. "A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1984) **81**(1): 202-205.
- [100] Guerrero, I., A. Villasante, V. Corces and A. Pellicer. "Activation of a c-K-ras oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation." *Science*, (1984) **225**(4667): 1159-1162.
- [101] Mizuki, K., K. Nose, H. Okamoto, N. Tsuchida and K. Hayashi. "Amplification of c-Ki-ras gene and aberrant expression of c-myc in WI-38 cells transformed in vitro by gamma-irradiation." *Biochem Biophys Res Commun*, (1985) **128**(2): 1037-1043.
- [102] Shih, T. Y., A. G. Papageorge, P. E. Stokes, M. O. Weeks and E. M. Scolnick. "Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus." *Nature*, (1980) **287**(5784): 686-691.
- [103] Gilman, A. G. "G proteins: transducers of receptor-generated signals." *Annu Rev Biochem*, (1987) **56**: 615-649.
- [104] McGrath, J. P., D. J. Capon, D. V. Goeddel and A. D. Levinson. "Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein." *Nature*, (1984) **310**(5979): 644-649.
- [105] Gibbs, J. B., I. S. Sigal, M. Poe and E. M. Scolnick. "Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1984) **81**(18): 5704-5708.
- [106] Sweet, R. W., S. Yokoyama, T. Kamata, J. R. Feramisco, M. Rosenberg and M. Gross. "The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity." *Nature*, (1984) **311**(5983): 273-275.
- [107] Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick. "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions." *Nature*, (1990) **348**(6297): 125-132.

- [108] Field, J., D. Broek, T. Kataoka and M. Wigler. "Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, (1987) **7**(6): 2128-2133.
- [109] Satoh, T., S. Nakamura and Y. Kaziro. "Induction of neurite formation in PC12 cells by microinjection of proto-oncogenic Ha-ras protein preincubated with guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)." *Mol Cell Biol*, (1987) **7**(12): 4553-4556.
- [110] Boguski, M. S. and F. McCormick. "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature*, (1993) **366**(6456): 643-654.
- [111] Donovan, S., K. M. Shannon and G. Bollag. "GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling." *Biochim Biophys Acta*, (2002) **1602**(1): 23-45.
- [112] Trahey, M. and F. McCormick. "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." *Science*, (1987) **238**(4826): 542-545.
- [113] Wolfman, A. and I. G. Macara. "A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras." *Science*, (1990) **248**(4951): 67-69.
- [114] Downward, J., J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter and D. A. Cantrell. "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." *Nature*, (1990) **346**(6286): 719-723.
- [115] Wittinghofer, A. and E. F. Pai. "The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch." *Trends Biochem Sci*, (1991) **16**(10): 382-387.
- [116] Milburn, M. V., L. Tong, A. M. deVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S. H. Kim. "Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins." *Science*, (1990) **247**(4945): 939-945.
- [117] Schlichting, I., S. C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko and et al. "Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis." *Nature*, (1990) **345**(6273): 309-315.
- [118] Herrmann, C. "Ras-effector interactions: after one decade." *Curr Opin Struct Biol*, (2003) **13**(1): 122-129.
- [119] Malumbres, M. and A. Pellicer. "RAS pathways to cell cycle control and cell transformation." *Front Biosci*, (1998) **3**: d887-912.

- [120] Ma, J. and M. Karplus. "Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1997) **94**(22): 11905-11910.
- [121] Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati and T. Jacks. "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." *Genes Dev*, (1997) **11**(19): 2468-2481.
- [122] Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba and M. Katsuki. "K-ras is essential for the development of the mouse embryo." *Oncogene*, (1997) **15**(10): 1151-1159.
- [123] Khalaf, W. F., H. White, M. J. Wenning, A. Orazi, R. Kapur and D. A. Ingram. "K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis." *Blood*, (2005) **105**(9): 3538-3541.
- [124] Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, P. Fernandez-Salguero, A. Fernandez-Medarde, N. Swaminathan, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. McKay, J. M. Ward, A. Pellicer and E. Santos. "Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development." *Mol Cell Biol*, (2001) **21**(5): 1444-1452.
- [125] Umanoff, H., W. Edelmann, A. Pellicer and R. Kucherlapati. "The murine N-ras gene is not essential for growth and development." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1995) **92**(5): 1709-1713.
- [126] Hancock, J. F. "Ras proteins: different signals from different locations." *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2003) **4**(5): 373-384.
- [127] Choy, E., V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov and M. R. Philips. "Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi." *Cell*, (1999) **98**(1): 69-80.
- [128] Dai, Q., E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis and M. R. Philips. "Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem*, (1998) **273**(24): 15030-15034.
- [129] Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs and C. J. Marshall. "All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated." *Cell*, (1989) **57**(7): 1167-1177.
- [130] Kim, E., P. Ambroziak, J. C. Otto, B. Taylor, M. Ashby, K. Shannon, P. J. Casey and S. G. Young. "Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras

processing and mislocalization of Ras within cells." *J Biol Chem*, (1999) **274**(13): 8383-8390.

[131] Roy, S., S. Plowman, B. Rotblat, I. A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R. G. Parton, Y. I. Henis, Y. Kloog and J. F. Hancock. "Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling." *Mol Cell Biol*, (2005) **25**(15): 6722-6733.

[132] Chiu, V. K., T. Bivona, A. Hach, J. B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R. L. Johnson, 2nd, A. D. Cox and M. R. Philips. "Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi." *Nat Cell Biol*, (2002) **4**(5): 343-350.

[133] Chen, Z., J. C. Otto, M. O. Bergo, S. G. Young and P. J. Casey. "The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules." *J Biol Chem*, (2000) **275**(52): 41251-41257.

[134] Thissen, J. A., J. M. Gross, K. Subramanian, T. Meyer and P. J. Casey. "Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking." *J Biol Chem*, (1997) **272**(48): 30362-30370.

[135] Voice, J. K., R. L. Klemke, A. Le and J. H. Jackson. "Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility." *J Biol Chem*, (1999) **274**(24): 17164-17170.

[136] Shih, T. Y., M. O. Weeks, P. Gruss, R. Dhar, S. Oroszlan and E. M. Scolnick. "Identification of a precursor in the biosynthesis of the p21 transforming protein of harvey murine sarcoma virus." *J Virol*, (1982) **42**(1): 253-261.

[137] Sefton, B. M., I. S. Trowbridge, J. A. Cooper and E. M. Scolnick. "The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid." *Cell*, (1982) **31**(2 Pt 1): 465-474.

[138] Willumsen, B. M., A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge and D. R. Lowy. "The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association." *Nature*, (1984) **310**(5978): 583-586.

[139] Willumsen, B. M., K. Norris, A. G. Papageorge, N. L. Hubbert and D. R. Lowy. "Harvey murine sarcoma virus p21 ras protein: biological and biochemical significance of the cysteine nearest the carboxy terminus." *EMBO J*, (1984) **3**(11): 2581-2585.

[140] Srivastava, S. K., J. C. Lacal, S. H. Reynolds and S. A. Aaronson. "Antibody of predetermined specificity to a carboxy-terminal region of H-ras gene products inhibits their guanine nucleotide-binding function." *Mol Cell Biol*, (1985) **5**(11): 3316-3319.

- [141] Casey, P. J., P. A. Solski, C. J. Der and J. E. Buss. "p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1989) **86**(21): 8323-8327.
- [142] Schafer, W. R., R. Kim, R. Sterne, J. Thorner, S. H. Kim and J. Rine. "Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans." *Science*, (1989) **245**(4916): 379-385.
- [143] Reiss, Y., J. L. Goldstein, M. C. Seabra, P. J. Casey and M. S. Brown. "Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides." *Cell*, (1990) **62**(1): 81-88.
- [144] Schaber, M. D., M. B. O'Hara, V. M. Garsky, S. C. Mosser, J. D. Bergstrom, S. L. Moores, M. S. Marshall, P. A. Friedman, R. A. Dixon and J. B. Gibbs. "Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase." *J Biol Chem*, (1990) **265**(25): 14701-14704.
- [145] Schafer, W. R., C. E. Trueblood, C. C. Yang, M. P. Mayer, S. Rosenberg, C. D. Poulter, S. H. Kim and J. Rine. "Enzymatic coupling of cholesterol intermediates to a mating pheromone precursor and to the ras protein." *Science*, (1990) **249**(4973): 1133-1139.
- [146] Hancock, J. F., H. Paterson and C. J. Marshall. "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane." *Cell*, (1990) **63**(1): 133-139.
- [147] Gibbs, J. B. and A. Oliff. "The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, (1997) **37**: 143-166.
- [148] Downward, J. "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer*, (2003) **3**(1): 11-22.
- [149] Niv, H., O. Gutman, Y. Kloog and Y. I. Henis. "Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells." *J Cell Biol*, (2002) **157**(5): 865-872.
- [150] Prior, I. A. and J. F. Hancock. "Compartmentalization of Ras proteins." *J Cell Sci*, (2001) **114**(Pt 9): 1603-1608.
- [151] Prior, I. A., C. Muncke, R. G. Parton and J. F. Hancock. "Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains." *J Cell Biol*, (2003) **160**(2): 165-170.
- [152] Prior, I. A., A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton and J. F. Hancock. "GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity." *Nat Cell Biol*, (2001) **3**(4): 368-375.

- [153] Jaumot, M., J. Yan, J. Clyde-Smith, J. Sluimer and J. F. Hancock. "The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem*, (2002) **277**(1): 272-278.
- [154] Roy, S., R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock and R. G. Parton. "Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains." *Nat Cell Biol*, (1999) **1**(2): 98-105.
- [155] Matallanas, D., I. Arozarena, M. T. Berciano, D. S. Aaronson, A. Pellicer, M. Lafarga and P. Crespo. "Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization." *J Biol Chem*, (2003) **278**(7): 4572-4581.
- [156] Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Ballan, H. J. Gabius and Y. Kloog. "Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem*, (2002) **277**(40): 37169-37175.
- [157] Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Balan and Y. Kloog. "Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity." *J Biol Chem*, (2004) **279**(33): 34922-34930.
- [158] Rocks, O., A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer and P. I. Bastiaens. "An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms." *Science*, (2005) **307**(5716): 1746-1752.
- [159] Goodwin, J. S., K. R. Drake, C. Rogers, L. Wright, J. Lippincott-Schwartz, M. R. Philips and A. K. Kenworthy. "Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway." *J Cell Biol*, (2005) **170**(2): 261-272.
- [160] Bivona, T. G., S. E. Quatela, B. O. Bodemann, I. M. Ahearn, M. J. Soskis, A. Mor, J. Miura, H. H. Wiener, L. Wright, S. G. Saba, D. Yim, A. Fein, I. Perez de Castro, C. Li, C. B. Thompson, A. D. Cox and M. R. Philips. "PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis." *Mol Cell*, (2006) **21**(4): 481-493.
- [161] Mitin, N., K. L. Rossman and C. J. Der. "Signaling interplay in Ras superfamily function." *Curr Biol*, (2005) **15**(14): R563-574.
- [162] Repasky, G. A., E. J. Chenette and C. J. Der. "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" *Trends Cell Biol*, (2004) **14**(11): 639-647.

- [163] Muroya, K., S. Hattori and S. Nakamura. "Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21ras in rat pheochromocytoma PC12 cells." *Oncogene*, (1992) **7**(2): 277-281.
- [164] Heasley, L. E. and G. L. Johnson. "The beta-PDGF receptor induces neuronal differentiation of PC12 cells." *Mol Biol Cell*, (1992) **3**(5): 545-553.
- [165] Traverse, S., N. Gomez, H. Paterson, C. Marshall and P. Cohen. "Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor." *Biochem J*, (1992) **288** ( Pt 2): 351-355.
- [166] Nguyen, T. T., J. C. Scimeca, C. Filloux, P. Peraldi, J. L. Carpentier and E. Van Obberghen. "Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor." *J Biol Chem*, (1993) **268**(13): 9803-9810.
- [167] Marshall, C. J. "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell*, (1995) **80**(2): 179-185.
- [168] Rodriguez-Viciana, P., C. Sabatier and F. McCormick. "Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate." *Mol Cell Biol*, (2004) **24**(11): 4943-4954.
- [169] Ponting, C. P. and D. R. Benjamin. "A novel family of Ras-binding domains." *Trends Biochem Sci*, (1996) **21**(11): 422-425.
- [170] Chong, H., H. G. Vikis and K. L. Guan. "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." *Cell Signal*, (2003) **15**(5): 463-469.
- [171] Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason and C. J. Marshall. "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J Biol Chem*, (1997) **272**(7): 4378-4383.
- [172] Mason, C. S., C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall and R. Marais. "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation." *EMBO J*, (1999) **18**(8): 2137-2148.
- [173] Seth, A., F. A. Gonzalez, S. Gupta, D. L. Raden and R. J. Davis. "Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem*, (1992) **267**(34): 24796-24804.



- [174] Chambers, A. F. and A. B. Tuck. "Ras-responsive genes and tumor metastasis." *Crit Rev Oncog*, (1993) **4**(2): 95-114.
- [175] Yordy, J. S. and R. C. Muise-Helmericks. "Signal transduction and the Ets family of transcription factors." *Oncogene*, (2000) **19**(55): 6503-6513.
- [176] Webb, C. P., L. Van Aelst, M. H. Wigler and G. F. Woude. "Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1998) **95**(15): 8773-8778.
- [177] Posada, J., N. Yew, N. G. Ahn, G. F. Vande Woude and J. A. Cooper. "Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro." *Mol Cell Biol*, (1993) **13**(4): 2546-2553.
- [178] Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude and N. G. Ahn. "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." *Science*, (1994) **265**(5174): 966-970.
- [179] Webb, C. P., G. A. Taylor, M. Jeffers, M. Fiscella, M. Oskarsson, J. H. Resau and G. F. Vande Woude. "Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis." *Oncogene*, (1998) **17**(16): 2019-2025.
- [180] Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, A. Khwaja, B. M. Marte, D. Pappin, P. Das, M. D. Waterfield, A. Ridley and J. Downward. "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras." *Cell*, (1997) **89**(3): 457-467.
- [181] Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield and J. Downward. "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." *Nature*, (1994) **370**(6490): 527-532.
- [182] Mayo, M. W., C. Y. Wang, P. C. Cogswell, K. S. Rogers-Graham, S. W. Lowe, C. J. Der and A. S. Baldwin, Jr. "Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras." *Science*, (1997) **278**(5344): 1812-1815.
- [183] Vivanco, I. and C. L. Sawyers. "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer*, (2002) **2**(7): 489-501.
- [184] Parsons, D. W., T. L. Wang, Y. Samuels, A. Bardelli, J. M. Cummins, L. DeLong, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer and V. E. Velculescu. "Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway." *Nature*, (2005) **436**(7052): 792.

- [185] Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings. "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *EMBO J*, (1996) **15**(23): 6541-6551.
- [186] Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini. "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science*, (2005) **307**(5712): 1098-1101.
- [187] Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su. "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." *Cell*, (2006) **127**(1): 125-137.
- [188] Nave, B. T., M. Ouwens, D. J. Withers, D. R. Alessi and P. R. Shepherd. "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation." *Biochem J*, (1999) **344 Pt 2**: 427-431.
- [189] Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan. "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol*, (2002) **4**(9): 648-657.
- [190] Shaw, L. M., I. Rabinovitz, H. H. Wang, A. Toker and A. M. Mercurio. "Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion." *Cell*, (1997) **91**(7): 949-960.
- [191] Burgering, B. M. and P. J. Coffey. "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." *Nature*, (1995) **376**(6541): 599-602.
- [192] Shaw, L. M. "Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion." *Mol Cell Biol*, (2001) **21**(15): 5082-5093.
- [193] Frisch, S. M. and E. Ruoslahti. "Integrins and anoikis." *Curr Opin Cell Biol*, (1997) **9**(5): 701-706.
- [194] Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne and J. Downward. "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway." *EMBO J*, (1997) **16**(10): 2783-2793.

- [195] Nimnual, A. S., B. A. Yatsula and D. Bar-Sagi. "Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos." *Science*, (1998) **279**(5350): 560-563.
- [196] Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R. D. Mosteller, U. M. Krishna, J. R. Falck, M. A. White and D. Broek. "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." *Science*, (1998) **279**(5350): 558-560.
- [197] Etienne-Manneville, S. and A. Hall. "Rho GTPases in cell biology." *Nature*, (2002) **420**(6916): 629-635.
- [198] Feig, L. A. "Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame." *Trends Cell Biol*, (2003) **13**(8): 419-425.
- [199] Hamad, N. M., J. H. Elconin, A. E. Karnoub, W. Bai, J. N. Rich, R. T. Abraham, C. J. Der and C. M. Counter. "Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells." *Genes Dev*, (2002) **16**(16): 2045-2057.
- [200] Ward, Y., W. Wang, E. Woodhouse, I. Linnoila, L. Liotta and K. Kelly. "Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and Ral-specific guanine exchange factor pathways." *Mol Cell Biol*, (2001) **21**(17): 5958-5969.
- [201] Wolthuis, R. M. and J. L. Bos. "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral." *Curr Opin Genet Dev*, (1999) **9**(1): 112-117.
- [202] Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane and J. F. Hancock. "Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem*, (1998) **273**(37): 24052-24056.
- [203] Walsh, A. B. and D. Bar-Sagi. "Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras." *J Biol Chem*, (2001) **276**(19): 15609-15615.
- [204] White, M. A., C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin and M. H. Wigler. "Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation." *Cell*, (1995) **80**(4): 533-541.
- [205] White, M. A., T. Vale, J. H. Camonis, E. Schaefer and M. H. Wigler. "A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation." *J Biol Chem*, (1996) **271**(28): 16439-16442.
- [206] Shieh, D. B., J. Godleski, J. E. Herndon, 2nd, T. Azuma, H. Mercer, D. J. Sugarbaker and D. J. Kwiatkowski. "Cell motility as a prognostic factor in Stage I

nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression." *Cancer*, (1999) **85**(1): 47-57.

[207] Rao, J., D. Seligson, H. Visapaa, S. Horvath, M. Eeva, K. Michel, A. Pantuck, A. Belldegrün and A. Palotie. "Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma." *Cancer*, (2002) **95**(6): 1247-1257.

[208] Azuma, T., W. Witke, T. P. Stossel, J. H. Hartwig and D. J. Kwiatkowski. "Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility." *EMBO J*, (1998) **17**(5): 1362-1370.

[209] De Corte, V., E. Bruyneel, C. Boucherie, M. Mareel, J. Vandekerckhove and J. Gettemans. "Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling." *EMBO J*, (2002) **21**(24): 6781-6790.

[210] Oft, M., J. Peli, C. Rudaz, H. Schwarz, H. Beug and E. Reichmann. "TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells." *Genes Dev*, (1996) **10**(19): 2462-2477.

[211] Oft, M., K. H. Heider and H. Beug. "TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis." *Curr Biol*, (1998) **8**(23): 1243-1252.

[212] Arsura, M., F. Mercurio, A. L. Oliver, S. S. Thorgeirsson and G. E. Sonenshein. "Role of the I $\kappa$ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells." *Mol Cell Biol*, (2000) **20**(15): 5381-5391.

[213] Janda, E., K. Lehmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug and S. Grunert. "Ras and TGF[ $\beta$ ] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways." *J Cell Biol*, (2002) **156**(2): 299-313.

[214] Westermarck, J. and V. M. Kahari. "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." *FASEB J*, (1999) **13**(8): 781-792.

[215] Bernhard, E. J., S. B. Gruber and R. J. Muschel. "Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1994) **91**(10): 4293-4297.

[216] Ballin, M., D. E. Gomez, C. C. Sinha and U. P. Thorgeirsson. "Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype." *Biochem Biophys Res Commun*, (1988) **154**(3): 832-838.

- [217] Thorgeirsson, U. P., T. Turpeenniemi-Hujanen, J. E. Williams, E. H. Westin, C. A. Heilman, J. E. Talmadge and L. A. Liotta. "NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice." *Mol Cell Biol*, (1985) **5**(1): 259-262.
- [218] Simon, C., H. Goepfert and D. Boyd. "Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion." *Cancer Res*, (1998) **58**(6): 1135-1139.
- [219] Westermarck, J., S. P. Li, T. Kallunki, J. Han and V. M. Kahari. "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression." *Mol Cell Biol*, (2001) **21**(7): 2373-2383.
- [220] Yang, J. Q., W. Zhao, H. Duan, M. E. Robbins, G. R. Buettner, L. W. Oberley and F. E. Domann. "v-Ha-RaS oncogene upregulates the 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) gene by increasing cellular superoxide production and activating NF-kappaB." *Free Radic Biol Med*, (2001) **31**(4): 520-529.
- [221] Thiery, J. P. "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer*, (2002) **2**(6): 442-454.
- [222] Gumbiner, B. M. "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." *Cell*, (1996) **84**(3): 345-357.
- [223] Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi and Y. Takai. "Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein." *J Cell Biol*, (1999) **145**(3): 539-549.
- [224] Yan, Z., M. Chen, M. Perucho and E. Friedman. "Oncogenic Ki-ras but not oncogenic Ha-ras blocks integrin beta1-chain maturation in colon epithelial cells." *J Biol Chem*, (1997) **272**(49): 30928-30936.
- [225] Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter and P. van der Geer. "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature*, (1994) **372**(6508): 786-791.
- [226] Rak, J., Y. Mitsuhashi, L. Bayko, J. Filmus, S. Shirasawa, T. Sasazuki and R. S. Kerbel. "Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis." *Cancer Res*, (1995) **55**(20): 4575-4580.

- [227] Grugel, S., G. Finkenzeller, K. Weindel, B. Barleon and D. Marme. "Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells." *J Biol Chem*, (1995) **270**(43): 25915-25919.
- [228] Chin, L., A. Tam, J. Pomerantz, M. Wong, J. Holash, N. Bardeesy, Q. Shen, R. O'Hagan, J. Pantginis, H. Zhou, J. W. Horner, 2nd, C. Cordon-Cardo, G. D. Yancopoulos and R. A. DePinho. "Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance." *Nature*, (1999) **400**(6743): 468-472.
- [229] Arbiser, J. L., M. A. Moses, C. A. Fernandez, N. Ghiso, Y. Cao, N. Klauber, D. Frank, M. Brownlee, E. Flynn, S. Parangi, H. R. Byers and J. Folkman. "Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1997) **94**(3): 861-866.
- [230] Casanova, M. L., F. Larcher, B. Casanova, R. Murillas, M. J. Fernandez-Acenero, C. Villanueva, J. Martinez-Palacio, A. Ullrich, C. J. Conti and J. L. Jorcano. "A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis." *Cancer Res*, (2002) **62**(12): 3402-3407.
- [231] Roberts, M. L., K. G. Drosopoulos, I. Vasileiou, M. Stricker, E. Taoufik, C. Maercker, A. Guialis, M. N. Alexis and A. Pintzas. "Microarray analysis of the differential transformation mediated by Kirsten and Harvey Ras oncogenes in a human colorectal adenocarcinoma cell line." *Int J Cancer*, (2006) **118**(3): 616-627.
- [232] Rabilloud, T. "Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline." *Methods Mol Biol*, (1999) **112**: 9-19.
- [233] Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann. "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem*, (1996) **68**(5): 850-858.
- [234] Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen and M. Mann. "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." *Nat Protoc*, (2006) **1**(6): 2856-2860.
- [235] Taylor, J. A. and R. S. Johnson. "Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom*, (1997) **11**(9): 1067-1075.
- [236] Liska, A. J. and A. Shevchenko. "Expanding the organismal scope of proteomics: cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications." *Proteomics*, (2003) **3**(1): 19-28.

- [237] Cengel, K. A., K. R. Voong, S. Chandrasekaran, L. Maggiorella, T. B. Brunner, E. Stanbridge, G. D. Kao, W. G. McKenna and E. J. Bernhard. "Oncogenic K-Ras signals through epidermal growth factor receptor and wild-type H-Ras to promote radiation survival in pancreatic and colorectal carcinoma cells." *Neoplasia*, (2007) **9**(4): 341-348.
- [238] Sherr, C. J. "Cancer cell cycles." *Science*, (1996) **274**(5293): 1672-1677.
- [239] Sherr, C. J. and J. M. Roberts. "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev*, (1999) **13**(12): 1501-1512.
- [240] Murray, A. W. "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell*, (2004) **116**(2): 221-234.
- [241] Weissman, A. M. "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2001) **2**(3): 169-178.
- [242] Pickart, C. M. "Back to the future with ubiquitin." *Cell*, (2004) **116**(2): 181-190.
- [243] Schmidt, C. R., M. K. Washington, Y. J. Gi, R. J. Coffey, R. D. Beauchamp and A. S. Pearson. "Dysregulation of E-cadherin by oncogenic Ras in intestinal epithelial cells is blocked by inhibiting MAP kinase." *Am J Surg*, (2003) **186**(5): 426-430.
- [244] Li, Q. and R. R. Mattingly. "Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells." *Neoplasia*, (2008) **10**(12): 1444-1458.
- [245] Mathias, R. A., Y. S. Chen, B. Wang, H. Ji, E. A. Kapp, R. L. Moritz, H. J. Zhu and R. J. Simpson. "Extracellular remodelling during oncogenic Ras-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates MDCK cell migration." *J Proteome Res*, (2010) **9**(2): 1007-1019.
- [246] Weinberg, R. A. "Oncogenes and tumor suppressor genes." *CA Cancer J Clin*, (1994) **44**(3): 160-170.
- [247] Boheler, K. R., J. Czyz, D. Tweedie, H. T. Yang, S. V. Anisimov and A. M. Wobus. "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes." *Circ Res*, (2002) **91**(3): 189-201.
- [248] Ikonomidou, G., M. Samiotaki and G. Panayotou. "Proteomic methodologies and their application in colorectal cancer research." *Crit Rev Clin Lab Sci*, (2009) **46**(5-6): 319-342.
- [249] Xu, B. J., J. Li, R. D. Beauchamp, Y. Shyr, M. Li, M. K. Washington, T. J. Yeatman, R. H. Whitehead, R. J. Coffey and R. M. Caprioli. "Identification of early

intestinal neoplasia protein biomarkers using laser capture microdissection and MALDI MS." *Mol Cell Proteomics*, (2009) **8**(5): 936-945.

[250] Drew, J. E., G. J. Rucklidge, G. Duncan, A. Lufty, A. J. Farquharson, M. D. Reid, W. R. Russell, P. C. Morrice, J. R. Arthur and G. G. Duthie. "A proteomics approach to identify changes in protein profiles in pre-cancerous colon." *Biochem Biophys Res Commun*, (2005) **330**(1): 81-87.

[251] Saldanha, R. G., N. Xu, M. P. Molloy, D. A. Veal and M. S. Baker. "Differential proteome expression associated with urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) suppression in malignant epithelial cancer." *J Proteome Res*, (2008) **7**(11): 4792-4806.

[252] Shin, Y. K., B. C. Yoo, H. J. Chang, E. Jeon, S. H. Hong, M. S. Jung, S. J. Lim and J. G. Park. "Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance." *Cancer Res*, (2005) **65**(8): 3162-3170.

[253] Skvortsov, S., B. Sarg, J. Loeffler-Ragg, I. Skvortsova, H. Lindner, H. Werner Ott, P. Lukas, K. Illmensee and H. Zwierzina. "Different proteome pattern of epidermal growth factor receptor-positive colorectal cancer cell lines that are responsive and nonresponsive to C225 antibody treatment." *Mol Cancer Ther*, (2004) **3**(12): 1551-1558.

[254] Zhang, J. T. and Y. Liu. "Use of comparative proteomics to identify potential resistance mechanisms in cancer treatment." *Cancer Treat Rev*, (2007) **33**(8): 741-756.

[255] Ma, Y., Z. Ding, Y. Qian, X. Shi, V. Castranova, E. J. Harner and L. Guo. "Predicting cancer drug response by proteomic profiling." *Clin Cancer Res*, (2006) **12**(15): 4583-4589.

[256] Ward, D. G., N. Suggett, Y. Cheng, W. Wei, H. Johnson, L. J. Billingham, T. Ismail, M. J. Wakelam, P. J. Johnson and A. Martin. "Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis." *Br J Cancer*, (2006) **94**(12): 1898-1905.

[257] Ward, D. G., S. Nyangoma, H. Joy, E. Hamilton, W. Wei, C. Tselepis, N. Steven, M. J. Wakelam, P. J. Johnson, T. Ismail and A. Martin. "Proteomic profiling of urine for the detection of colon cancer." *Proteome Sci*, (2008) **6**: 19.



- [258] Liu, X. P., J. Shen, Z. F. Li, L. Yan and J. Gu. "A serum proteomic pattern for the detection of colorectal adenocarcinoma using surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry." *Cancer Invest*, (2006) **24**(8): 747-753.
- [259] Stulik, J., L. Hernychova, S. Porkertova, J. Knizek, A. Macela, J. Bures, P. Jandik, J. I. Langridge and P. R. Jungblut. "Proteome study of colorectal carcinogenesis." *Electrophoresis*, (2001) **22**(14): 3019-3025.
- [260] Nibbe, R. K., S. Markowitz, L. Myeroff, R. Ewing and M. R. Chance. "Discovery and scoring of protein interaction subnetworks discriminative of late stage human colon cancer." *Mol Cell Proteomics*, (2009) **8**(4): 827-845.
- [261] Friedman, D. B., S. Hill, J. W. Keller, N. B. Merchant, S. E. Levy, R. J. Coffey and R. M. Caprioli. "Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics*, (2004) **4**(3): 793-811.
- [262] Kim, H. J., H. J. Kang, H. Lee, S. T. Lee, M. H. Yu, H. Kim and C. Lee. "Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer." *J Proteome Res*, (2009) **8**(3): 1368-1379.
- [263] Kang, B., C. Hao, H. Wang, J. Zhang, R. Xing, J. Shao, W. Li, N. Xu, Y. Lu and S. Liu. "Evaluation of hepatic-metastasis risk of colorectal cancer upon the protein signature of PI3K/AKT pathway." *J Proteome Res*, (2008) **7**(8): 3507-3515.
- [264] Alfonso, P., A. Nunez, J. Madoz-Gurpide, L. Lombardia, L. Sanchez and J. I. Casal. "Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis." *Proteomics*, (2005) **5**(10): 2602-2611.
- [265] Alfonso, P., M. Canamero, F. Fernandez-Carbonie, A. Nunez and J. I. Casal. "Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labeling." *J Proteome Res*, (2008) **7**(10): 4247-4255.
- [266] Zhao, L., H. Wang, J. Li, Y. Liu and Y. Ding. "Overexpression of Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with tumor progression and poor prognosis of colorectal cancer." *J Proteome Res*, (2008) **7**(9): 3994-4003.
- [267] Balasubramani, M., B. W. Day, R. E. Schoen and R. H. Getzenberg. "Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer." *Cancer Res*, (2006) **66**(2): 763-769.
- [268] Bi, X., Q. Lin, T. W. Foo, S. Joshi, T. You, H. M. Shen, C. N. Ong, P. Y. Cheah, K. W. Eu and C. L. Hew. "Proteomic analysis of colorectal cancer reveals

alterations in metabolic pathways: mechanism of tumorigenesis." *Mol Cell Proteomics*, (2006) **5**(6): 1119-1130.

[269] Ma, Y., J. Peng, W. Liu, P. Zhang, L. Huang, B. Gao, T. Shen, Y. Zhou, H. Chen, Z. Chu, M. Zhang and H. Qin. "Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer." *Mol Cell Proteomics*, (2009) **8**(8): 1878-1890.

[270] Conrotto, P., C. Roesli, J. Rybak, P. Kischel, D. Waltregny, D. Neri and V. Castronovo. "Identification of new accessible tumor antigens in human colon cancer by ex vivo protein biotinylation and comparative mass spectrometry analysis." *Int J Cancer*, (2008) **123**(12): 2856-2864.

[271] Roessler, M., W. Rollinger, S. Palme, M. L. Hagmann, P. Berndt, A. M. Engel, B. Schneidinger, M. Pfeffer, H. Andres, J. Karl, H. Bodenmuller, J. Ruschoff, T. Henkel, G. Rohr, S. Rossol, W. Rosch, H. Langen, W. Zolg and M. Tacke. "Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer." *Clin Cancer Res*, (2005) **11**(18): 6550-6557.

[272] Kim, H., H. J. Kang, K. T. You, S. H. Kim, K. Y. Lee, T. I. Kim, C. Kim, S. Y. Song, H. J. Kim and C. Lee. "Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival." *Proteomics*, (2006) **6**(11): 3466-3476.

[273] Xing, X., M. Lai, W. Gartner, E. Xu, Q. Huang, H. Li and G. Chen. "Identification of differentially expressed proteins in colorectal cancer by proteomics: down-regulation of secretagogen." *Proteomics*, (2006) **6**(9): 2916-2923.

[274] Ji, H., R. L. Moritz, Y. S. Kim, H. J. Zhu and R. J. Simpson. "Analysis of Ras-induced oncogenic transformation of NIH-3T3 cells using differential-display 2-DE proteomics." *Electrophoresis*, (2007) **28**(12): 1997-2008.

[275] Recktenwald, C. V., S. Mendler, R. Lichtenfels, R. Kellner and B. Seliger. "Influence of Ki-ras-driven oncogenic transformation on the protein network of murine fibroblasts." *Proteomics*, (2007) **7**(3): 385-398.

[276] Jin, B. F., K. He, H. X. Wang, B. Bai, T. Zhou, H. Y. Li, J. H. Man, B. Y. Liu, W. L. Gong, J. Wang, A. L. Li and X. M. Zhang. "Proteomics analysis reveals insight into the mechanism of H-Ras-mediated transformation." *J Proteome Res*, (2006) **5**(10): 2815-2823.

[277] Mathias, R. A., B. Wang, H. Ji, E. A. Kapp, R. L. Moritz, H. J. Zhu and R. J. Simpson. "Secretome-based proteomic profiling of Ras-transformed MDCK cells

reveals extracellular modulators of epithelial-mesenchymal transition." *J Proteome Res*, (2009) **8**(6): 2827-2837.

[278] Keller, J. W., J. L. Franklin, R. Graves-Deal, D. B. Friedman, C. W. Whitwell and R. J. Coffey. "Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium." *J Cell Physiol*, (2007) **210**(3): 740-749.

[279] Reddy, K. B., S. M. Nabha and N. Atanaskova. "Role of MAP kinase in tumor progression and invasion." *Cancer Metastasis Rev*, (2003) **22**(4): 395-403.

[280] Jeanes, A., C. J. Gottardi and A. S. Yap. "Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?" *Oncogene*, (2008) **27**(55): 6920-6929.

[281] Quinlan, M. P., S. E. Quatela, M. R. Philips and J. Settleman. "Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiate tumors of endodermal origin via stem cell expansion." *Mol Cell Biol*, (2008) **28**(8): 2659-2674.

[282] Feng, J., F. Hua, R. Shuo, G. Chongfeng, X. Huimian, T. Nakajima, W. Subao and N. Tsuchida. "Upregulation of non-mutated H-ras and its upstream and downstream signaling proteins in colorectal cancer." *Oncol Rep*, (2001) **8**(6): 1409-1413.